



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Prof. Rolando Martínez J.
Instituto de Química
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante
Dr. Víctor Cubillos G.
Instituto de Patología Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias

EFFECTO HIPOGUCEMIANTE DE LA INFUSIÓN DE *Leptocarpha rivularis* EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY DIABÉTICAS TIPO II POR INDUCCIÓN CON ALOXANO

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de **Licenciado en Bioquímica** y Título Profesional de **Bioquímico**

CAROLINA VICTORIA ALVAREZ CONTRERAS

VALDIVIA-CHILE

2005

A mis Padres.

Al Prof. Rolando Martínez.

AGRADECIMIENTOS

De la Facultad de Ciencias Veterinarias al Instituto de Patología Animal, especialmente al Dr. Víctor Cubillos por haber aceptado trabajar en conjunto a nosotros y especialmente a la Dra. Claudia López por la cantidad de tiempo destinado a este trabajo de tesis, apoyo y enseñanza.

También de esta Facultad, al Instituto de Farmacología, por la facilitación de su Bioterio, sin el cual habría sido imposible la realización de este trabajo, especialmente a Don Darío Salazar, por todo el apoyo brindado en la mantención de los roedores.

De La Facultad de Medicina, al Instituto de Histología y Patología, especialmente a la Dra. Sara Rodríguez por su apoyo y capacitación en el manejo de animales de Laboratorio y permanente orientación. A Don Genaro Alvear, por la realización de los cortes histológicos y su enseñanza en esta área.

De la Facultad de Ciencias, al Instituto de Bioquímica, muy especialmente a la Dra. Gloria León, por el permanente apoyo tanto en el periodo de formación académica, como en la realización de esta tesis, por mostrarme la importancia de los conocimientos en Bioquímica Clínica y tantas cosas, hoy aparte de maestra la considero una verdadera amiga.

Del Instituto de Bioquímica a Dr. J. Guillermo Cárcamo por su disposición y constante apoyo mientras se efectuó esta y otras investigaciones.

Al personal del Instituto de Química, por su permanente ayuda durante mi larga estancia en este lugar, especialmente a Jaime Rosales , gracias.

Al Laboratorio Clínico de Valdivia y todo su personal, por la facilitación de sus equipos e instalaciones.

A todos mis amigos, que de una u otra forma me ayudaron, Carla, Carito, Enrique siempre que tuve dudas y necesite alguna cosa, ustedes estuvieron ahí. Ariel, Paula, Iván, siempre que necesite una mano, estuvieron hay para ayudarme, especialmente a Hochi por la cantidad de horas dedicadas a este trabajo, no te olvidaré nunca amigo. Juan Carlos y Daniela, que nunca dudaron en acompañarme en mis visitas a horas poco comunes, apoyo y animo en mis momentos de debilidad y cansancio. A todos por complementar mi vida profesional y personal.

A mis padres y mi Primi, por comprender mis horarios, mal genio y apoyarme incondicionalmente durante tanto tiempo.

A mi Patrocinante Prof. Rolando Martínez, por la cantidad de años de dedicación a mi formación científica y humana, apoyo, comprensión, su permanente confianza en mi persona, sin él no habría llegado a la meta ni seria quién soy hoy en día, la palabra gracias no alcanza.

Al proyecto DID-UACH S-44-2003 por el financiamiento de esta tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

	INDICE DE CONTENIDOS	i
	INDICE DE TABLAS	iv
	INDICE DE FIGURAS	vii
	LISTA DE ABREVIATURAS	x
1	RESUMEN	1
1	ABSTRACT	3
2	INTRODUCCIÓN	
2.1.	Hallazgos Históricos y Perspectivas Futuras	4
2.2.	Antecedentes Generales y Moleculares	6
2.3.	Patogenia de la Diabetes Mellitus Tipo II	10
2.4.	Control del Estado Diabético y Agentes Hipoglicemiantes Orales	11
2.5.	Objetivos	17
3	MATERIALES Y METODOS	
3.1	Materiales	18
3.1.2.	Inducción de Diabetes mellitus	18
3.1.3.	Estudio de laboratorio clínico	18
3.1.3.	Estudio anátomo e histopatológico	18
3.1.4.	Inmunohistoquímica y estudio morfométrico	18
3.1.5.	Reactivos	18
3.2.	Métodos	

3.2.1.	Inducción de Diabetes mellitus Tipo II	19
3.2.2.	Observación de signos clínicos	21
3.2.3.	Estudio de parámetros clínicos	21
3.2.3.1.	Determinación de Hemoglobina Glicosilada	23
3.2.3.2.	Método de análisis de la determinación del nivel de peroxidación lipídica en plasma	24
3.2.3.3.	Test de Tolerancia Oral a la Glucosa	24
3.2.4.	Evaluación Microscópica	25
3.2.5.	Inmunohistoquímica (IHQ) y Estudio Morfométrico	25
4	RESULTADOS	
4.1.	Signos Clínicos	29
4.2.	Resultados de laboratorio clínico	34
4.2.1.	Determinación de glicemia por grupos	37
4.2.2.	Determinación de proteínas totales	40
4.2.3.	Determinación de albúmina sérica	43
4.2.4.	Determinación de la Concentración de Colesterol Total	46
4.2.5.	Determinación de HDL-Colesterol	49
4.2.6.	Determinación de triglicéridos en Suero	52
4.2.7.	Determinación de LDL-Colesterol	55
4.2.8.	Calculo del índice aterogénico	58
4.2.9.	Determinación de urea sérica	61
4.2.10.	Determinación de creatinina sérica	64

4.2.11. Determinación de transaminasas	67
4.2.12. Determinación de hemoglobina glicosilada	67
4.2.13. Concentración de Peroxidación Lipídica en Plasma	70
4.2.14. Test de Tolerancia Oral a la Glucosa	73
4.3. Evaluación microscópica	76
4.3.1. Lesiones microscópicas en páncreas	78
4.4. Inmunohistoquímica (IHQ) y estudio morfométrico	80
4.4.1. Área inmunomarcada en islotes de Langerhans	83
5 DISCUSIÓN	
5.1. Inducción de NIDDM	87
5.2. Estudio de laboratorio clínico	87
5.3. Estudio microscópico, IHQ y morfometría	92
CONCLUSIONES	96
6 BIBLIOGRAFÍA	97

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Resumen de los parámetros clínicos evaluados y sus respectivos métodos de estudio de los grupos experimentales	22
TABLA 2.	Peso corporal de ratas controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	30
TABLA 3.	Variación del peso corporal, expresado en porcentaje, de ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , respecto del peso de inicio del tratamiento	32
TABLA 4.	Signos clínicos observados en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo post inducción.	35
TABLA 5.	Parámetros clínicos evaluados según significancia estadística en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] .	36
TABLA 6.	Parámetros clínicos evaluados según significancia estadística en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] .	38
TABLA 7.	Concentración de proteínas totales en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	41

TABLA 8.	Albúmina sérica en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	44
TABLA 9.	Colesterol total en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo post inducción (promedio \pm DE).	47
TABLA 10.	Concentración de HDL - colesterol en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	50
TABLA 11.	Concentración plasmática de triglicéridos en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	53
TABLA 12.	Concentración de LDL-Colesterol calculados según formula matemática en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	56
TABLA 13.	Índice aterogénico calculado en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento.	59
TABLA 14.	Concentración de urea en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	62

TABLA 15. Concentración de creatinina en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	65
TABLA 16. Porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	68
TABLA 17. Niveles de lipoperoxidación lipídica en plasma, expresados en mmoles/L de TBARs en ratas control y con Diabetes mellitus tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	71
TABLA 18. Test de tolerancia oral a la glucosa en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] .	74
TABLA 19. Número promedio de islotes de Langerhans por grupo, en 10 campos (4x), en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento.	77
TABLA 20. Área promedio de los islotes de Langerhans (μm^2) en ratas controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	81
TABLA 21. Área inmunomarcada \pm D.E. (%) en islotes de Langerhans en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano [®] , según tiempo de tratamiento.	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Técnica de Streptavidina- Peroxidasa para la detección de insulina en células β de páncreas de ratas, mediante IHQ.	27
Figura 2.	Resumen de la cronología experimental.	28
Figura 3.	Variación del peso corporal de ratas control y con Diabetes mellitus tipo II inducida con Alozano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	31
Figura 4.	Variación del peso corporal de ratas control y con Diabetes mellitus II inducida con Alozano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE), según la diferencia con T0.	33
Figura 5.	Concentración de glucosa plasmática de ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	39
Figura 6.	Concentración de proteínas totales en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	42
Figura 7.	Concentración de albúmina sérica en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	45
Figura 8.	Concentraciones de colesterol total en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano [®] , según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).	48

- Figura 9.** Variación en la concentración de HDL – colesterol en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 51
- Figura 10.** Variación de la concentración de triglicéridos en ratas Controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo post inducción (promedio \pm DE). 54
- Figura 11.** Variación, en el tiempo, de la concentración de LDL-Colesterol en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 57
- Figura 12.** Incremento del índice aterogénico en ratas Controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento. 60
- Figura 13.** Concentración de urea sérica en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 63
- Figura 14.** Concentración de creatinina en ratas control y con Diabetes mellitus tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 66
- Figura 15.** Porcentaje de hemoglobina glicosilada en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 69

- Figura 16.** Variación de la concentración de peroxidación lipídica determinada en plasma de ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 72
- Figura 17.** Test de tolerancia oral a la glucosa en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®]. 75
- Figura 18.** Islotes de Langerhans H/E. Aumento: 400x. 79
- Figura 19.** Variación en el área de los islotes de Langerhans en grupos de ratas con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). 82
- Figura 20.** Área inmunomarcada de los islotes de Langerhans en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento. (promedio \pm DE). 85
- Figura 21.** Células β inmunopositivas en islote de Langerhans. Streptavidina-Peroxidasa. 86

INDICE DE ABREVIATURAS

ADA	: Asociación americana de diabetes.
AGE	: Glicosilación avanzada de productos finales.
AIM	: Area Inmunomarcada.
BHT	: Butilhidroxitolueno.
DAB	: Diaminobencidina.
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético.
EROs	: Especies reactivas del oxígeno.
HMF	: Hidroximetilfuranol.
IHQ	: Inmunohistoquímica.
MDA	: Malondialdehido.
NIDDM	: Diabetes mellitus no insulino dependiente.
PL	: Peroxidación lipídica.
SU	: Sulfonilureas.
TBA	: Ácido tiobarbitúrico.
TBARS	: Sustancias reactivas del ácido tiobabitúrico.
TCA	: Ácido tricloroacético.
TEP	: 1,1,3,3 Tetraetoxipropano.
TTOG	: Test de tolerancia oral a glucosa.
UKPDS	: Estudio prospectivo de diabetes del Reino Unido.

1. RESUMEN

La Diabetes mellitus tipo II es una condición en la que el páncreas no produce cantidades suficientes de insulina para procesar satisfactoriamente la glucosa circulante o la acción de los receptores para este metabolito no es eficiente. Existe un aumento en el número de personas que cada día son diagnosticadas con NIDDM, debido al aumento de la obesidad y al estilo de vida sedentario. Sin embargo, en muchos lugares alrededor del mundo esta patología es controlada con el uso de plantas de la medicina tradicional.

En el presente estudio se investigó el efecto hipoglicemiante de la administración oral del infuso de *Leptocarpha rivularis* en ratas diabéticas por inducción con Aloxano[®].

El tratamiento de ratas diabéticas con la planta no sólo demostró un efecto antidiabético, sino también beneficiosos efectos hipocolesterolémicos y de otros parámetros bioquímicos analizados. Todos estos resultados fueron comparados con ratas diabéticas control y normales tratadas.

Se encontraron cambios histopatológicos en el páncreas endocrino de las ratas diabéticas, entre los que se observó, irregularidades en la forma de los Islotes de Langerhans, fibrosis y una depleción en el número de células. También se encontró una reducción, en el tamaño de los islotes y reducción del AIM para insulina.

Estos hallazgos proporcionan bases bioquímicas para el uso de *Leptocarpha rivularis* en el manejo de pacientes con Diabetes mellitus tipo II, y confirma el rol de esta planta como una terapia de uso tradicional.

1. ABSTRACT

Type II Diabetes mellitus is a condition in the body where the pancreas does not produce enough insulin to process glucose or insulin receptors are not working properly. A growing number of people each day are diagnosed with NIDDM, due to the rise in obesity and sedentary lifestyle. In many places throughout the world, Diabetes is kept under control by the use of medical plant treatment.

The present study investigates the hypoglycemic effect of oral administration of the infusion of *Leptocarpha rivularis* in alloxan- induced diabetic rats.

Treatment of diabetic rats with the plants not only showed significantly anti-hyperglycemic effect but also hypolipidemic effect and in other biochemical parameters analyzed. Results were compared with untreated normal and diabetic control rats.

Histopathological changes in the endocrine pancreas in diabetics rats include irregular shape, fibrosis, and progressive depletion on islet β cells. We also found reduction of β cell volume and reduced immunoreaction to insulin.

This findings provide some biochemicals basis for the use of the *Leptocarpha rivularis* in the management of patients with type II diabetes and confirm its role as a traditional antidiabetic remedy.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Hallazgos históricos y perspectivas futuras.

La Diabetes mellitus es una enfermedad que ya era conocida en el siglo IV a.C., como lo demuestra el papiro de Ebers, que hablaba de una enfermedad que hoy se conoce como Diabetes. Sin embargo, fue Arateo de Capadocia, quien en el siglo II d.C. le dio el nombre de “Diabetes”, del griego “sifón”, refiriéndose a la exagerada cantidad de orina excretada por los pacientes que la padecen. En 1679 Tomás Willis la denominó “Diabetes mellitus” refiriéndose al sabor dulce de la orina (sabor a miel). Durante la segunda mitad del siglo XIX el clínico francés Bouchardat señaló la importancia de la obesidad y de la vida sedentaria en el origen de la diabetes, marcando un precedente sobre las normas para el tratamiento dietético, basado en la restricción de los glúcidos y en un bajo valor calórico de la dieta. En 1869 el patólogo Langerhans describió los islotes pancreáticos y diferenció la existencia de dos tipos de células secretoras, las llamadas células α y las células β . De éstas últimas, hoy sabemos que son las responsables de la secreción de insulina. El científico ruso Oskar Minkowski, entre los años 1889 y 1890, indujo experimentalmente un cuadro de diabetes en un perro al realizar una pancreatectomía, dejando en evidencia la relación entre la regulación de la glucemia y el páncreas endocrino. Nicolae Paulescu publicó en 1921 un artículo científico en el que describió el aislamiento de la insulina. En el mismo año, los científicos Frederick G. Banting y Charles H. Best aislaron, según el procedimiento descrito por Paulescu, insulina de perro la que administraron a un joven diabético canadiense llamado Leonard Thompson, estableciendo que la diabetes podía ser controlada por medio de la administración exógena de insulina (Macfarlane, 1989).

En la actualidad, la Diabetes mellitus se divide en dos tipos; la Diabetes mellitus tipo I (insulino dependiente) que suele manifestarse en la pubertad y se caracteriza por niveles reducidos o ausentes de insulina debido a la destrucción de las células β por un ataque autoinmune. La diabetes de tipo II (insulino independiente), puede manifestarse a cualquier edad, pero preferentemente durante la adultez. Se asocia a una dieta rica en carbohidratos y a personas con sobrepeso. Si bien aún existe secreción de insulina, ésta no es capaz de metabolizar correctamente la glucosa circulante en la sangre, y por lo tanto, se acumula (Figuerola, 1997).

La Diabetes mellitus tipo II o no insulino dependiente (NIDDM) representa el 98% de los tipos de diabetes y es una de las enfermedades de más alta incidencia mundial, alcanzando cifras aproximadas de un 5%, según la Asociación de Diabetes Americana (ADA). En Estados Unidos el número de adultos con diabetes ha aumentado un 49% entre los años 1991 y 2000. Además, entre 16 y 17 millones de personas no saben que poseen esta enfermedad y un número similar se encuentra en una etapa considerada como prediabética. Junto a estos datos, se entregaron estadísticas de la población mundial con cifras que en el año 2002 existían 150 millones de diabéticos en el mundo y que aumentará a 300 millones para el año 2025 (Mokdad, 2002).

Las causas de esta epidemia se deben principalmente al aumento de la obesidad en la población, debido a malos hábitos alimenticios acompañados de una vida sedentaria, un problema en aumento en niños y adultos jóvenes, lo que otorga un panorama devastador al pensar en la edad de comienzo de la enfermedad. Por otra

parte, hábitos tales como el tabaquismo y el consumo desmedido de alcohol, alta ingesta de grasas y calorías, aumentan el factor de riesgo de desarrollar esta patología. Numerosos estudios demuestran también cómo algunos grupos étnicos tienen mayores tasas de incidencia en el desarrollo de la enfermedad; como es el caso de los indios Pima de Norteamérica, de los que alrededor del 50% de los adultos desarrollan diabetes. Estos datos muestran la influencia, tanto de factores genéticos, como de factores medio ambientales y socioculturales. Todos estos antecedentes han originado, a partir de 1950, la focalización de millones de dólares en salud pública e investigación de nuevos fármacos y tecnologías de monitoreo de los pacientes que padecen esta enfermedad en el mundo, acompañadas de campañas poco exitosas para tomar conciencia sobre la enfermedad y evitar la temprana aparición de ésta.

La causa primaria de NIDDM se debe a que durante años el cuerpo se hace resistente a la acción de la insulina, acompañada más tarde por una producción y secreción deficiente de la hormona, por parte de las células β del páncreas. Los pacientes que padecen la enfermedad desarrollan una serie de complicaciones crónicas, siendo la cuarta causal de muerte en Estados Unidos (Lebovitz, 1995), acompañada de diversas patologías degenerativas, que incluyen daño de la función renal, retinopatía, neuropatía, graves daños en pies y piernas, que llegan incluso a requerir de amputación, hipertensión y un sin número de otras patologías asociadas.

2.2. Antecedentes generales y moleculares.

La insulina es la principal hormona encargada de disminuir los niveles de glucosa en la sangre. Esta hormona aumenta el transporte de glucosa al interior de las células y su conversión a glucógeno, además incrementa la oxidación del azúcar. Favorece el proceso de síntesis de lípidos y disminuye, tanto la movilización de grasa desde sus depósitos, como su oxidación en el hígado; también aumenta el transporte de algunos aminoácidos en las células blanco (Guyton y Hall, 2002).

La insulina es una hormona peptídica que se sintetiza como preproinsulina en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. La preproinsulina entonces es escindida a proinsulina que se transporta al aparato de Golgi donde es empaquetada en gránulos secretores localizados adyacentes a la membrana celular. La mayor parte de la proinsulina se transforma a cantidades equimolares de insulina y "péptido C" en los gránulos secretorios, convirtiéndose así en dos cadenas polipeptídicas, una de 21 aminoácidos (α) y otra de 30 (cadena β), unidas por dos puentes disulfuro. El proceso de secreción de insulina involucra la fusión de los gránulos secretores con la membrana de la célula y la exocitosis de insulina, péptido C y trazas de pro insulina (Ettinger y Feldman, 2000).

De la insulina que llega al hígado, prácticamente la mitad es eliminada y la que permanece en la circulación periférica, tiene una vida media de unos 20 minutos y posteriormente es degradada por las insulinasas del hígado y riñón.

La secreción de insulina en respuesta a los niveles de glucosa en sangre, se realiza en dos pasos, en el primero se libera la hormona previamente sintetizada y en el segundo, la proinsulina es transformada en la molécula activa. Esta liberación está controlada por la acción de estimulantes de los receptores β , como el isoproterenol,

y es inhibida por agentes β -bloqueadores, como el propanolol. También pueden ser inhibida, por estímulos vagales de los neurotransmisores adrenalina, noradrenalina, serotonina y por 2-desoxiglucosa.

La insulina actúa en varias reacciones celulares. Primero, se une a receptores específicos que se encuentran en las células efectoras, la interacción que se produce entre la hormona y sus receptores, va seguida de la disminución de los niveles intracelulares de AMPc, controlando su aumento provocado por el glucagón y catecolaminas, especialmente a nivel hepático. Por lo tanto, una de las acciones de la insulina es modular la actividad de las hormonas dependientes del AMPc.

En ausencia de insulina, la glucosa no puede ser transportada eficientemente a los tejidos muscular y adiposo (Yki-Jarvinen, 1994). Transcurrido un tiempo, esto se refleja en pérdida de peso por la imposibilidad de las células para utilizar la glucosa circulante. Como mecanismo compensatorio, se origina el catabolismo de tejido adiposo y muscular, como modo de obtención de energía. A medida que la deficiencia de insulina se vuelve más severa, existe una mayor probabilidad de desarrollar cetoacidosis (Feldman y Nelson, 2004; Nelson 2000) y una serie de otras complicaciones. Para su comprensión y estudio comúnmente, las complicaciones se dividen en agudas (cetoacidosis diabética y estado hiperosmolar) y crónicas (retinopatía, nefropatía, neuropatía, aterosclerosis, problemas gastrointestinales y disfunción sexual). El estado de hiperglicemia sostenida genera profundas modificaciones en el medio ambiente celular, que se traducen en alteraciones en el comportamiento enzimático y variaciones estructurales de muchas proteínas (Maritim et al., 2003).

Los valores de glicemia elevados conducen a un aumento del estrés oxidativo. Esto se debe a que la glucosa se autooxida, dando lugar a la formación de alfacetoaldehídos, peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, entre otras especies reactivas del oxígeno (EROs) (Clapes et al., 2001). También se plantea que el descontrol de la glicemia conduce al incremento en la velocidad de los procesos de glicosilación, oxidación de lípidos y proteínas de membrana, ocasionando cambios conformacionales de estas macromoléculas, deteriorando sus funciones. Los productos que se forman se conocen como AGE (advanced glycosilation endproducts), donde algunas de estas sustancias formadas con carácter de irreversibles pueden formar enlaces covalentes con otras proteínas potenciando así el daño (Kebapçı et al., 1999).

Las teorías que vinculan el estrés oxidativo con la diabetes, plantean que la hiperglicemia *per se* es esencial en el desarrollo de las patologías asociadas al estado diabético. Entre estas teorías se proponen: alteraciones en la vía del poliol, insuficiencia vascular, síntesis alterada de óxido nítrico, transporte axonal desajustado, glicosilación de lípidos y proteínas, principalmente las vinculadas con el estrés oxidativo (Brownlee, 1992).

Por lo tanto, se considera que el estrés oxidativo puede ser una vía común, que relaciona mecanismos antes considerados independientes, pero que convergen en el papel que desempeñan el incremento de EROs, AGE y los productos de PL en la explicación de la fisiopatología de las enfermedades frecuentemente encontradas en el paciente diabético (Pfaffly, 2001). Ver figura anexa 2.

2.3. Patogenia de la Diabetes mellitus tipo II.

Por años ha sido tema de debate sí la patogenia de la Diabetes mellitus tipo II comienza con la resistencia de los tejidos periféricos a la insulina o con una disfunción de las células β pancreáticas (Olefsky, 1992; Pimenta et al., 1995). Puede parecer paradójico el hecho que un incremento en la producción de insulina represente una disfunción, ocasionando el agotamiento de las células β , disminuyendo la producción de la hormona hasta concentraciones insuficientes, apareciendo los primeros signos de diabetes.

Cantidades de insulina inferiores a los requerimientos, producen un déficit energético en el organismo, el que se compensa recurriendo primariamente a la utilización de los depósitos de glicógeno del tejido muscular y hepático. Con posterioridad se hace uso de vías alternativas, donde la formación de glucosa se realiza a partir del metabolismo de lípidos (ácidos grasos) y proteico (aminoácidos) en el hígado. Es así, como la glucosa obtenida de la alimentación, por gluconeogénesis y de glucogenolisis hepática, se acumula en la circulación sanguínea, provocando hiperglicemia (Chastain y Ganjman, 1990; Atkinson y Maclaren, 1994).

Cuando la concentración de glucosa plasmática excede rangos entre 160-180 mg/dl (Committee Report, 2003), la capacidad de los epitelios renales para reabsorberla se ve limitada, apareciendo glucosuria, responsable de la diuresis osmótica que se traduce en poliuria. La pérdida de agua combinada con la hiperosmolaridad derivada de la hiperglicemia conduce a la salida de agua del espacio inter e intracelular, lo cual estimula los osmoreceptores del centro de la sed en el cerebro, dando como

resultado una polidipsia compensatoria, a fin de evitar la deshidratación del paciente (Crawford y Cotran, 2000; Nelson, 2000). En la región ventromedial del hipotálamo se encuentra el centro de la saciedad, el cual guarda estrecha relación con la sensación de hambre. El ingreso de glucosa a dicho centro es regulado por la insulina; de esta forma la sensación de hambre está en relación inversa a la cantidad de glucosa que ingresa. En pacientes diabéticos, la falta relativa o absoluta de insulina determina el ingreso de glucosa al centro de la saciedad, originando polifagia aún en presencia de hiperglicemia (Nelson, 2000). De esta forma se completa la clásica triada de la DM: Poliuria, polidipsia y polifagia.

La disminución de la utilización periférica de glucosa, conduce al catabolismo de las reservas musculares y del tejido adiposo, con disminución de peso y por ende, de la condición corporal.

2.4. Control del estado diabético y agentes hipoglicemiantes orales.

Cuando un paciente es diagnosticado con NIDDM, lo primero que se intenta para el control de la diabetes son modificaciones en su estilo de vida, los que incluyen cambios en la dieta, junto con un incremento de la actividad física según las propias posibilidades de cada individuo. Todo esto debe ir acompañado por un buen monitoreo de los niveles de glucosa sanguínea. Sin embargo, estudios recientes sugieren que esto sólo previene el brusco aumento en la mayoría de los individuos (Toumilehto et al., 2001).

Normalmente se sugiere guardar las terapias farmacológicas para quienes no puedan controlar la enfermedad con un cambio en el estilo de vida (Figuerola, 1997).

Según datos entregados por el Reino Unido, el 83% de estos pacientes al comienzo responden bien a la dieta, pero pasado un corto tiempo, entre 1 a dos años, requieren además de algún fármaco hipoglicemiante (UKPDS group, 1995).

En la actualidad, el médico puede escoger entre un amplio espectro de fármacos para el control del estado diabético. Existen 5 grupos principales de fármacos hipoglicemiantes orales, los que pueden ser administrados individual o en forma conjunta (Ver tabla anexa I).

Aún cuando los avances en la farmacología hipoglicemiante oral son reconocibles, existen pocos datos estadísticos del fracaso de la terapia hipoglicemiante oral por parte de laboratorios y entidades médicas tratantes.

El fracaso de los agentes hipoglicemiantes orales puede definirse como: “la inhabilidad para provocar una respuesta satisfactoria, respaldado por parámetros bioquímicos, aún después de altas dosis de drogas antidiabéticas” (Leif et al., 1989).

Este fracaso puede ser subdividido en primario, definido como la imposibilidad de alcanzar niveles de glucosa satisfactorios después de un mes de comenzada la terapia; y secundario, cuando un paciente después de presentar una buena respuesta al principio del tratamiento, en el transcurso de un año presenta un pobre control de la glicemia o en tres diferentes ocasiones presenta niveles de glucosa en ayunas mayores a 180 mg/dl (Leif et al., 1986).

El escenario global indica que entre el 15 y 20% de los pacientes recién diagnosticados con NIDDM presentan falla primaria en respuesta a las sulfonilureas, acompañado por un 5% con falla de tipo secundaria. Fallas en la respuesta primaria a Metformina alcanzan un 12% y secundaria, alrededor de un 5%. Datos aún menos alentadores se obtuvieron a través de un estudio de 4 años y medio de duración, que mostró que no hay diferencias entre la terapia con tolbutamida y el grupo al que se le suministró un placebo (Banerjee et al., 2002).

Todo lo anterior se suma a datos que indican que el 28% de los pacientes tratados con SU presentaron niveles de glicemia elevados a los tres años de tratamiento aún aumentando las dosis, un 10% necesitó de un tratamiento adicional con metformina y un 5% necesitó de insulina (Banerjee et al., 2002).

Otro aspecto a considerar es el rol desempeñado por la medicina folclórica en el control del estado diabético y de sus patologías asociadas. En países principalmente orientales, tales como China e India, se comunican anualmente cientos de investigaciones dedicadas al tema de Diabetes y de tratamientos paliativos para los múltiples desórdenes orgánicos que ésta produce. A esta labor, más tardíamente se han sumado Brasil y casi incipientemente, Chile. Su rica flora y los conocimientos en medicina tradicional propia de las distintas áreas geográficas, nos dan algunas pistas sobre este tema. *Leptocarpha rivularis* es una especie nativa de la décima región utilizada desde tiempos ancestrales en la medicina mapuche para tratar mayoritariamente dolencias relacionadas con el sistema digestivo. Después de estudios realizados por Martínez (resultados no publicados), se ha encontrado interesantes actividades de algunos de sus metabolitos, pero entre éstas, no se

había estudiado el efecto hipoglicemiante hasta ahora. En el estudio Fase Clínica II de la actividad biológica de Leptocarpina y de infusos de la planta sobre otras patologías (neoplasias), realizados en el Hospital San Borja Arriarán e Instituto Chileno Japonés de Enfermedades Digestivas. Anecdóticamente, se observó que pacientes que también sufrían de Diabetes evolucionaron positivamente frente a esta enfermedad, no requiriendo durante el transcurso del tratamiento, del uso de fármacos hipoglicemiantes tradicionales. Estos resultados impulsaron a investigar el efecto de los infusos y su posible rol hipoglicemiante.

Tabla anexa I. Principales agentes hipoglicemiantes de uso común, mecanismo de acción y efectos indeseados asociados.

Agente hipoglicemiante	Mecanismo acción	Efectos colaterales
Acarbosa	Inhibidores de la α glucosidasa de la mucosa intestinal	Distensión abdominal Dolores abdominales Flatulencia Ocasionalmente diarrea
Sulfonilureas	Estimulación de la secreción de insulina	Hipoglicemia grave Náuseas Vómitos Hipertensión Agranulocitosis
Biguanidas	Supresión de la producción de glucosa hepática.	Disfunción hepática Disfunción renal
Tiazolidinedionas	Agonista de los receptores nucleares PPAR γ	Afinidad no específica sobre gran número de genes. Represión de la histona diacetilasa.

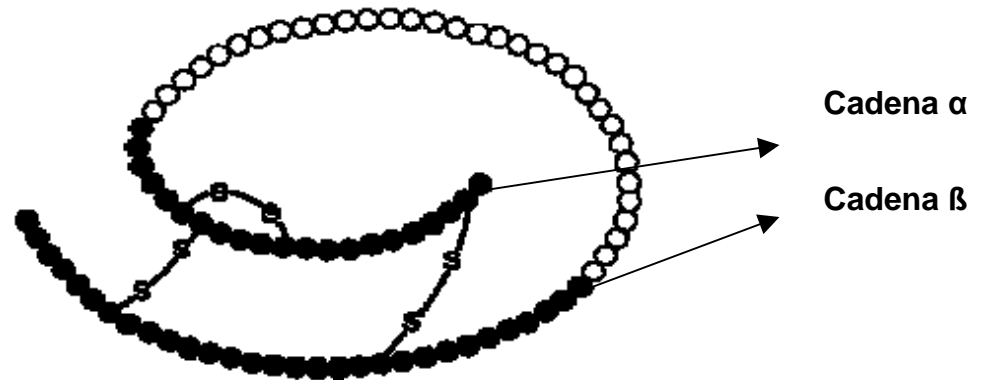


Figura anexa 1. Molécula de insulina compuesta de cadenas α y β , puentes disulfuro y péptido C en blanco (Goodman, 1997).

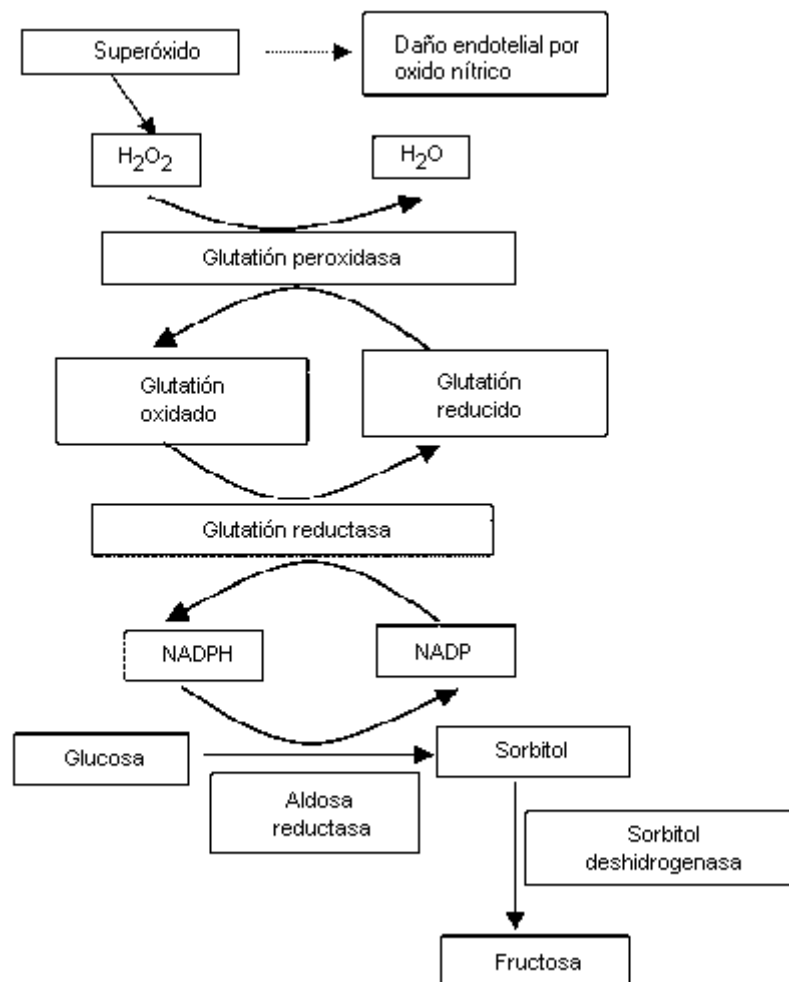


Figura anexa 2. Vía hipotética del poliol y su acción sobre los niveles de glucosa circulantes (Latha, 2004).

2.5. Objetivos

2.5.1. Objetivos generales

- Obtener un modelo animal para el estudio de NIDDM.
- Estudiar el efecto hipoglicemiante de *Leptocarpha rivularis*.

2.5.2. Objetivos específicos

- Inducir NIDDM con Alozano[®] en ratas macho adultas Sprague- Dawley.
- Evaluar el efecto como agente hipoglicemiante en el tiempo del extracto acuoso de *Leptocarpha rivularis* según parámetros clínicos de uso frecuente para el control diabético.
- Estudiar diferencias histopatológicas en páncreas entre los distintos grupos en función del tiempo.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

Se utilizaron 50 ratas Sprague – Dawley macho adultas, obtenidas desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile.

3.1.1. Inducción de Diabetes mellitus. Para la inducción de DM tipo II se empleó Alozano[®] A-7413 (5,6 Dioxyuracil Monohidratado).

3.1.2. Estudio de laboratorio clínico. Se utilizaron muestras de sangre de ratas clínicamente sanas y con DM inducida por Alozano[®].

3.1.3. Estudio histopatológico. Se utilizaron páncreas de ratas clínicamente sanas y con DM inducida por Alozano[®].

3.1.4. Inmunohistoquímica y estudio morfométrico. El material estuvo constituido por los cortes histológicos de páncreas de la totalidad de los animales en estudio.

3.1.5. Reactivos.

- **De Dako[®].** Complejo Streptavidina- Peroxidasa.
- **De Human[®].** Estándar hemoglobina glicosilada.
- **De Merck[®].** Tetracloruro de carbono, dietil éter, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, cloruro de sodio, n-butanol, pirimidina, glucosa.

- **De Sigma-Aldrich®**. Aloxano monohidratado, 1,1,3,3, Tetraetoxipropano, hidroxibutiltolueno, ácido tiobarbitúrico, etanol.
- **De Vector®**. Anticuerpo secundario biotinilado (Anti IgG cobayo-cabra).
- **De Zymed®**. Anticuerpo primario policlonal antiinsulina porcina (IgG-cobayo), DAB.

Los resultados correspondientes a los distintos parámetros de bioquímica sanguínea, fueron procesados en el Programa Graphpad Prism 4.0, complementado con una planilla Excel 2000, y se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva (promedios y desviación estándar). La distribución de los datos se determinó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. La comparación de los valores de bioquímica clínica en el tiempo, se efectuó empleando la prueba de ANDEVA de muestras repetidas. En el caso de los estudios morfométricos, los datos fueron sometidos a un ANDEVA. En aquellos casos en que se observaron diferencias significativas, se recurrió a la prueba de comparación múltiple de Tukey Kramer, empleando un nivel de significación de 5%.

3.2. Métodos

3.2.1.- Inducción de Diabetes mellitus tipo II.

A un total de 36 ratas macho adultas Sprague-Dawley de 16 semanas, con pesos entre 300- 350 gramos, con condición corporal normal, fueron divididas en grupos A y B de igual número de individuos, constatando el estado normoglicémico de la

totalidad de las ratas utilizadas previamente. Las ratas fueron mantenidas en ayuno prolongado de 20 horas previas al tratamiento. Al grupo A se le administró 3 veces una dosis de Aloxano^R (75 mg/kg de peso corporal, vía i.p.), con 48 horas de intervalo entre cada una (Alarcón-Aguilar et al., 2000; Nimenibo-Uadia, 2003). Al segundo grupo se le administró suero fisiológico utilizado como vehículo. Los animales se mantuvieron bajo condiciones similares de ciclo luz/oscuridad (12 horas cada ciclo), temperatura estandarizada entre 20-24 °C y disponibilidad de agua y alimento *ad limitum*.

Se realizaron controles habituales de glicemia hasta la cuarta semana, para determinar el estado diabético de las ratas tratadas con Aloxano[®]. Una vez establecida la hiperglicemia, cada grupo se subdividió en dos grupos, DT: (Diabéticos tratados) y DC: (Diabéticos control). Lo mismo se realizó en el caso del grupo B, el que se subdividió en CT: (Control tratado) y CC: (Control Control). A los grupos tratados se les administró diariamente, por medio de una sonda bucoesofágica, 2 ml de una infusión de *Leptocarpha rivularis* 0,120 mg/dl, durante 10 semanas. Por su parte, a los grupos control se les administró, de forma similar agua destilada.

Las muestras para la determinación de los parámetros clínicos de rigor, se obtuvieron por punción del seno retroorbicular, después de 8-10 horas de ayuno. Una vez coaguladas, se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos, para la separación del suero y se congelaron a -20° C hasta su análisis.

- T0: Día 1 de comienzo del tratamiento con la infusión.

- T1: 4 semana de tratamiento.
- T2: 7 semana de tratamiento.
- T3: 10 semana de tratamiento.

Al día siguiente de la toma de muestras de T1, T2 y T3, tres individuos de cada grupo experimental fueron anestesiados con éter etílico, para ser sacrificados por punción cardíaca, para la obtención de muestras de plasma con EDTA. Se extrajeron muestras de páncreas para su posterior análisis.

La investigación llevada a cabo, formó parte del Proyecto de Investigación S-44-2003, de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile. Para su realización, el proyecto fue sometido a evaluación, cumpliendo con los requisitos estipulados por el Comité “Uso de Animales en Investigación” de la Universidad Austral de Chile.

3.2.2. Observación de signos clínicos.

La observación clínica se basó en los signos que comúnmente se observan en pacientes diabéticos y modelos animales. Además, de la exploración de otros signos que puedan ser secundarios al tratamiento con la infusión de la planta, considerándose de interés, polidipsia, poliuria, polifagia de forma cualitativa, cambios en el peso corporal en forma cuantitativa.

3.2.3. Estudio de parámetros clínicos.

Los parámetros clínicos medidos en este estudio y sus métodos se resumen en la tabla 1.

TABLA 1. Resumen de los parámetros clínicos evaluados y sus respectivos métodos de estudio de los grupos experimentales.

Parámetro clínico	Método
Glicemia	Método para determinación de glucosa GOD-PAP. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Proteínas Totales	Método de determinación de proteínas de Biuret. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Albúmina	Método del verde de bromocresol. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Colesterol total	Método enzimático CHOD-PAP. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
HDL- Colesterol	Método precipitante con clohidrato de magnesio. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Triglicéridos	Método enzimático GPO-PAP. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Transaminasa Glutámico Pirúvica (ALAT)	Método cinético UV- IFCC. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Transaminasa glutámico oxalacética (ASAT)	Método cinético UV- IFCC. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Creatinina	Método cinético alcalino pícrico. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Urea	Método enzimático Ureasa-Salicilato. Kit de diagnóstico clínico Valtek®.
Hemoglobina glicosilada	Método de Fluckiger y Winterhalter modificado por Subramanian (Subramian et al., 1980)

3.2.3.1. Determinación de hemoglobina glicosilada.

Para provocar la lisis de los eritrocitos, a 2 ml de sangre obtenida con EDTA, se agregó 10 ml de suero fisiológico, se centrifugó a 3000xg descartando el sobrenadante y se realizaron dos nuevos lavados, agregando 2 ml de agua destilada con 0,5 ml de tetracloruro de carbono. Las muestras se centrifugaron a 1500xg por 15 minutos y el sobrenadante obtenido, se almacenó a -20°C . A 1 ml de dicho hemolizado se le agregó 15 ml de acetona acidificada a 4°C para lograr la separación del hierro del grupo hemo. Luego de esto, se centrifugó a 3600xg a 4°C , del precipitado antes obtenido, se lavó tres veces con acetona fría para eliminar el ácido remanente, se realizó un lavado con dietil éter, para secar las muestras bajo atmósfera de nitrógeno y ser almacenadas a -20°C .

Las muestras se resuspendieron en suero fisiológico, luego se tomó una alícuota de 10 μl para medir la concentración de proteínas por el método de Biuret. Una vez conocida la concentración, se tomó la cantidad correspondiente a 75 mg de globina que se digirieron con 5 ml de ácido acético 10M, durante 16 horas a 100°C en tubos falcón de 15 ml, para enfriar a temperatura ambiente. Se tomó 1 ml de la solución digerida y se agregó 2 ml de TCA 20% y dejando reaccionar durante 5 minutos, se agregaron 2 ml de TBA 0,35%, centrifugando por 10 minutos a 1400xg. El sobrenadante se incubó durante 50 minutos a 40°C . La absorbancia se leyó a 443 nm contra un estándar comercial de hemoglobina glicosilada de 7.4%.

3.2.3.2. Método de análisis de la determinación del nivel de peroxidación lipídica en plasma.

Según el método colorimétrico de TBAs, propuesto por Asakawa y Matsushita modificado por Estepa (Estepa et al., 2001) a 100 μ l de plasma se le adicionó 100 μ l de reactivo antioxidante (BHT 2,2 g/L, en etanol), 100 μ l del reactivo catalizador (Tricloruro de hierro 2,7 g/L, en agua destilada) y 1,5 ml de solución tampón (75,05 g de glicocola y 58,44 g de NaCl en un litro de agua destilada a pH= 3,5). Se mantuvieron por 60 minutos a 5°C en oscuridad; transcurrido dicho tiempo las muestras fueron colocadas en un baño a ebullición por 60 minutos (en tubos falcón para evitar la evaporación). A continuación, se agregaron 2,5 ml de una solución de n-butanol-pirimidina y 0,5 ml de agua destilada fría. La mezcla se centrifugó a 4000xg durante 10 minutos, el sobrenadante fue separado para leer la absorbancia a 532 nm frente a un blanco de la solución reactiva. Para la construcción de la curva de calibración, se utilizó como patrón una solución de TEP 20% en solución tampón. Los valores obtenidos se expresaron como μ moles/L de TBARs.

3.2.3.3. Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG).

A cuatro individuos de cada grupo experimental se les administró una dosis de glucosa correspondiente a 2 g/kg de peso corporal, utilizando una sonda buco esofágica. Del grupo CC se tomaron ocho animales, de los cuales a cuatro de éstos se les suministró inmediatamente después de la glucosa, una dosis del infuso de la planta (2 ml de la infusión 0,120 mg/dl).

Para esta determinación, las ratas fueron mantenidas en ayuno de 10 horas y a modo de respetar su ritmo circadiano las mediciones fueron realizadas a las 9 PM. Las mediciones de glicemia se efectuaron a 0, 30, 60, 120 y 180 minutos respectivamente, por punción en el extremo de las colas con el glucómetro Accu –

Chek[®] Active de Roche Diagnostics. Los datos aquí obtenidos se promediaron y graficaron para analizar las curvas correspondientes.

3.2.4. Evaluación microscópica.

Las muestras de páncreas para examen histopatológico fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito por Gomez-Dumm et al. (1995). Los tejidos fueron fijados en Bouin alcohólico, posteriormente laminados y procesados de acuerdo a las técnicas histológicas de rutina (Luna, 1968).

3.2.5. Inmunohistoquímica (IHQ) y estudio morfométrico.

Para la identificación de insulina en las células β de los islotes de Langerhans, las muestras fueron fijadas en Bouin alcohólico durante 48 h. La detección de insulina en las células β se realizó mediante la técnica de Streptavidina-Peroxidasa, utilizándose para el montaje los siguientes reactivos (Figura 1), (López, 2004).

- Ac. primario policlonal anti-insulina porcina (IgG – cobayo) (Zymed[®], Cat N° 18-0067).
- Ac. secundario biotinilado (Anti IgG cobayo – en cabra) (Vector[®], Cat N° BA 7000)
- Complejo Streptavidina-Peroxidasa (Dako[®] Cat N° P-0397)
- DAB (Zymed[®], Cat N° 00-2014)

Para la estandarización de la técnica de IHQ y la determinación de la dilución óptima del anticuerpo primario, se utilizaron muestras de páncreas procedentes de una rata sana (Control). Dichas muestras fueron incubadas utilizándose seis diluciones en

tampón PBS pH 7.2 (1:50 – dilución recomendada por la empresa fabricante) 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600) en tres tiempos diferentes:

- a 37°C - 1 hora.
- a temperatura ambiente - 2 horas.
- a 4°C – 12 horas.

Finalmente, se eligió la dilución 1:1000, la que se incubó 12 horas a 4°C, según la intensidad de la reacción y el background obtenidos.

En relación con el anticuerpo secundario y el complejo Streptavidina-Peroxidasa, se utilizó la dilución promedio recomendada por la empresa fabricante para estudios inmunohistoquímicos, la cual fue en ambos casos, de 1:500, incubándose a temperatura ambiente por el lapso de una hora.

Finalizadas las incubaciones, los tejidos se lavaron 3 veces con PBS mantenido a temperatura ambiente, procediéndose a la revelación de la reacción con DAB por un 1 minuto (Figura 1).

Para el estudio morfométrico, se utilizaron cortes histológicos de páncreas teñidos con H/E de la totalidad de los grupos en estudio. Las imágenes se capturaron a partir de un microscopio Olympus Modelo CX31RBSFA utilizando para ello una cámara digital Nikon Coolpix 995. Posteriormente, se recurrió a un programa informático de análisis de imágenes (ImageProPlus® v. 4.1, Media Cybernetics), el cual permitió determinar el área de los islotes de Langerhans en la totalidad de los grupos en estudio.

Para la determinación del **área de los islotes de Langerhans** por grupo, se procedió a seleccionar 10 islotes de Langerhans al azar de la totalidad de los grupos en estudio.

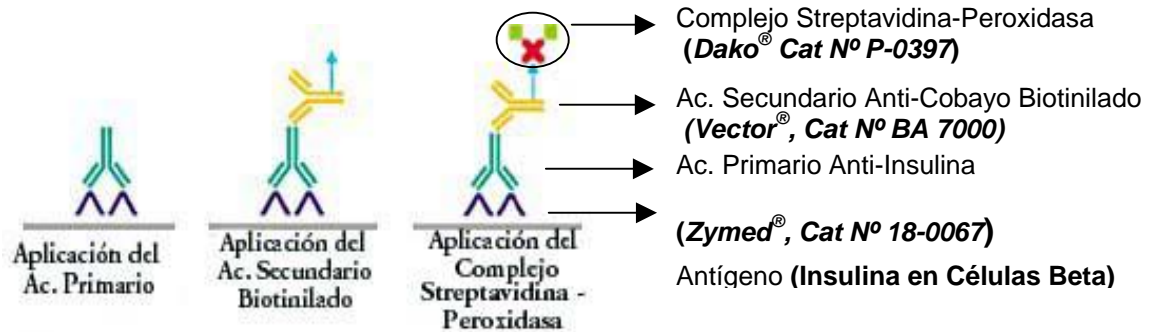
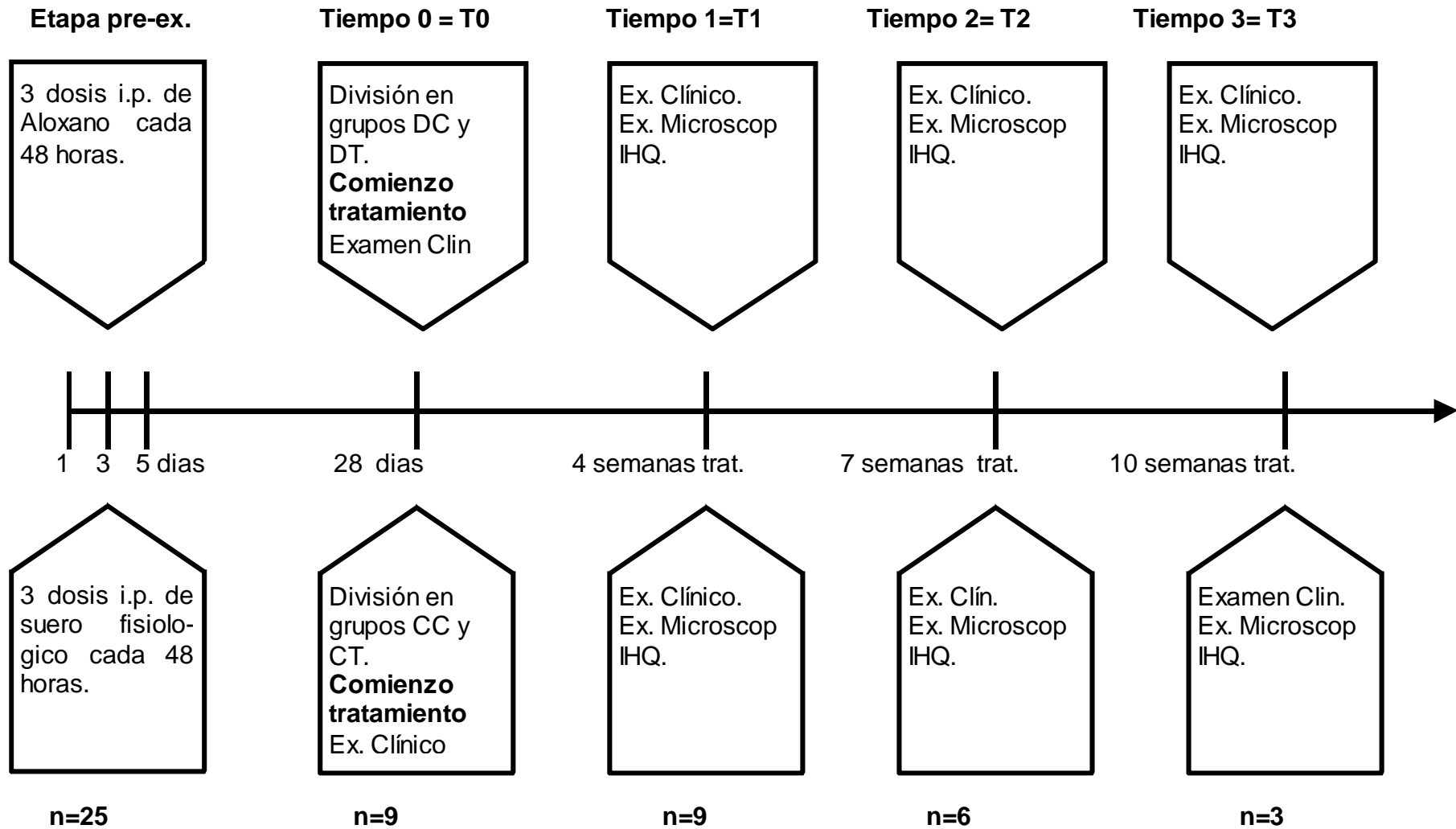


Figura 1. Técnica de Streptavidina- Peroxidasa para la detección de insulina en células β de páncreas de ratas, mediante IHQ.

Figura 2. Resumen de la cronología experimental. (n= número de individuos por grupo).



4. RESULTADOS

4.1. Signos clínicos.

Es conocido que, tanto en pacientes diabéticos como en animales ocupados como modelos experimentales, una vez establecido el estado diabético se produce una pérdida abrupta de peso en un corto período de tiempo. En este caso, se pudo presenciar cómo estas ratas, con pesos entre 300 a 350 g para el momento de inducción de diabetes, sufrieron un rápido descenso frente a los controles. Sin embargo, se observó cómo en T3, el aumento final en peso fue mayor para las ratas diabéticas tratadas, pero sin embargo no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) debido a la gran dispersión de valores del grupo DC.

A modo de esquematizar mejor esta situación se calculó la diferencia de peso expresado como porcentaje de aumento de peso en el tiempo, basándose en el tiempo cero, donde sí se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Es relevante señalar que los grupos que presentaron mayor crecimiento en el tiempo expresado en porcentaje, una vez comenzado el tratamiento, fue DT, incluso mayor que CC.

TABLA 2. Peso corporal de ratas controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Peso corporal (g)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	488.0 \pm 52.8	487.2 \pm 54.2	396.5 \pm 55.4	391.8 \pm 75.4	
1	506.2 \pm 47.5	523.9 \pm 51.3	446.5 \pm 130.9	523.9 \pm 51.3	
2	539.2 \pm 59.4	558.2 \pm 57.1	463.8 \pm 153.9	464.9 \pm 105.8	
3	613.7 \pm 50.6	551.0 \pm 72.0	483.7 \pm 232.5	521.0 \pm 48.4	

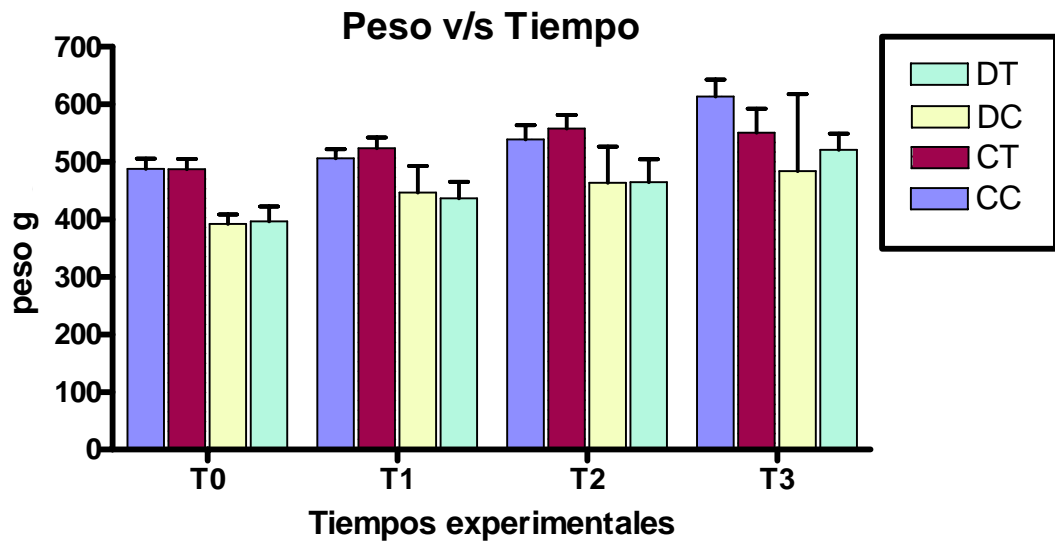


Figura 3. Variación del peso corporal de ratas control y con Diabetes mellitus tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

TABLA 3. Variación del peso corporal, expresado en porcentaje, de ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], respecto del peso de inicio del tratamiento.

		Variación de peso corporal (%)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
T1-T0	15.8	7.3	13.9	9.9	
T2-T0	10.2	15.5	18.3	17.2	
T3-T0	25.4	12.9	18.2	30.5	

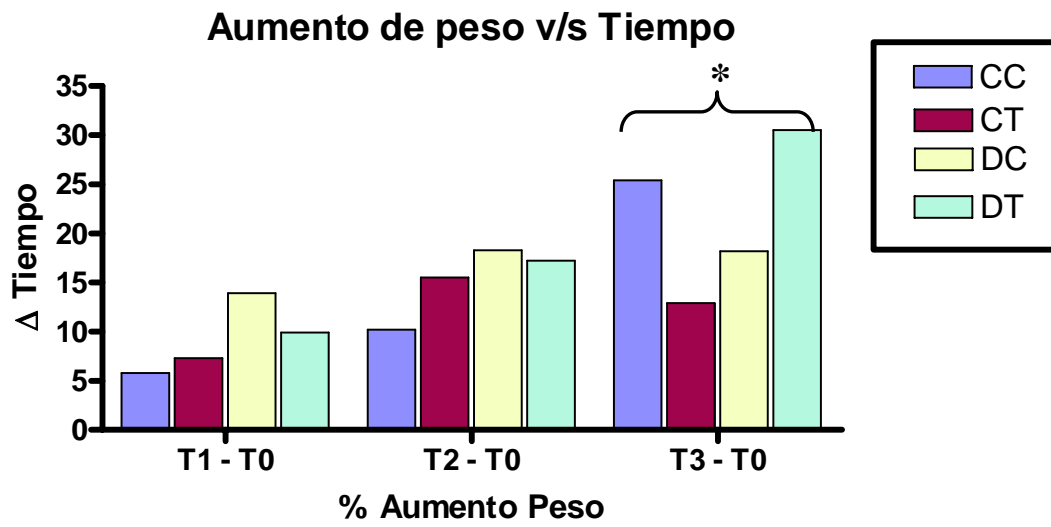


Figura 4. Variación del peso corporal de ratas control y con Diabetes mellitus II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE), según la diferencia con T0. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre grupos.

Los animales diabéticos inducidos con Alozano[®] presentaron signos clínicos equivalentes a los encontrados en humanos diabéticos, polidipsia, poliuria y polifagia. Otro hallazgo fue la presencia de lesiones atribuibles a la enfermedad, “lesiones cutáneas tipo pie diabético”, aparecieron aproximadamente en T2 en el grupo de animales no tratados con la infusión, las que aumentaron de severidad con el tiempo. Estos signos se resumen en la Tabla 4.

4.2. Resultados de laboratorio clínico.

Los resultados obtenidos por los métodos antes descritos se resumen en la tabla 5.

TABLA 4. Signos clínicos observados en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo post inducción.

Tiempo	T1				T2				T3			
Grupo	PU	PD	PF	Otro	PU	PD	PF	Otro	PU	PD	PF	Otro
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	-	-	-	-	-	-	-	+ ¹	-	-	-	++ ¹
DC	++	+++	+	-	+++	+++	++	+ ²	++++	++++	++++	++ ²
DT	++	++	+	-	+	+	++	+	-	-	+	++ ¹

PU = poliuria; PD = polidipsia; PF = polifagia.

1 = Cambio conductual expresado como agresividad; 2 = Lesiones cutáneas tipo pie diabético.

- = Ausencia; + = leve; ++ = moderada; +++ = severa; ++++ = muy severa.

TABLA 5. Parámetros clínicos evaluados según significancia estadística en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano®.

Parámetros clínicos	P < 0.05 entre grupos
Glicemia	Si
Prot. Totales	NO
Albúmina	NO
Colesterol total	Si
HDL- colesterol	NO
Triglicéridos	Si
Urea	NO
Creatinina	NO
ASAT	-
ALAT	-
Hemoglobina glicosilada	NO

4.2.1. Determinación de glicemia por grupos.

Se consideró como diabéticos, los individuos que tras un ayuno de 8 - 10 horas presentaban glicemias ≥ 200 mg/dl mantenidas durante el mes transcurrido entre la inducción de diabetes y el comienzo del tratamiento, basados en los valores aceptados internacionalmente por la OMS para humanos, la cual es de 160 mg/dl en ayunas. En el tiempo experimental T0 se puede observar una marcada diferencia entre los grupos diabéticos y los controles, la que disminuye en el transcurso del tratamiento llegando a valores sin significancia estadística ($p > 0.05$) para el tiempo T3 entre los grupos CT, CC y DT, demostrándose el efecto hipoglicemiante del tratamiento sin presentarse una brusca caída de los valores de glicemia, como ocurre con la farmacología tradicional, aún en individuos sanos.

TABLA 6. Valores de glicemia en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Glicemia (mg/dl)			
Grupo		CC	CT	DC	DT
Tiempo					
0		145.1 \pm 15.4	134.6 \pm 10.6	256.3 \pm 59.5	286.6 \pm 82.4
1		153.1 \pm 36.6	152.9 \pm 21.1	318.7 \pm 71.7	193.4 \pm 36.6
2		158.0 \pm 10.9	142.0 \pm 11.7	401.5 \pm 133.8	174.3 \pm 8.9
3		166.7 \pm 39.3	110.7 \pm 38.2	346.7 \pm 132.8	170.3 \pm 45.5

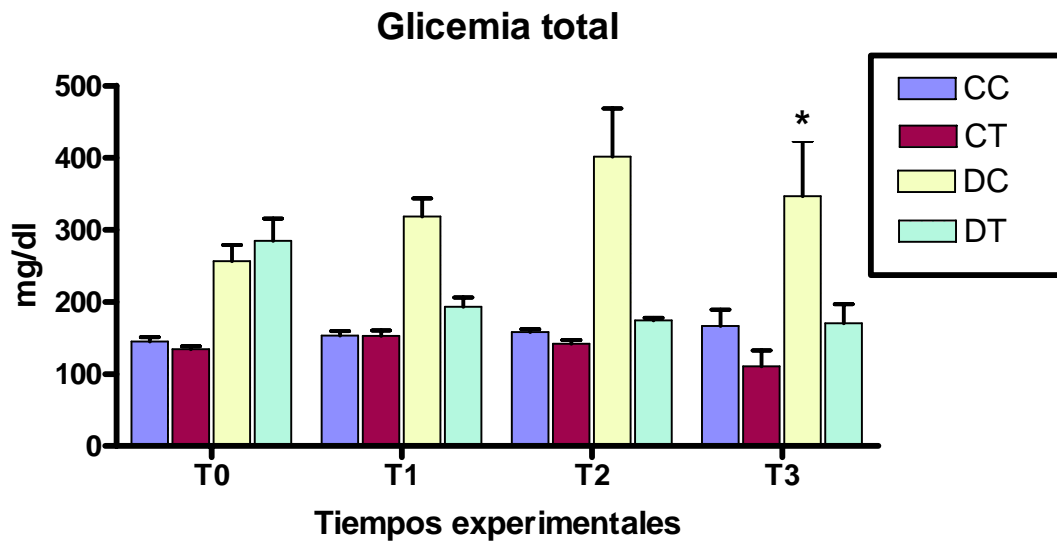


Figura 5. Concentración de glucosa plasmática de ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). * Indica diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros grupos experimentales.

4.2.2. Determinación de proteínas totales.

La concentración de proteínas totales puede variar producto de varias patologías, como la nefropatía diabética y la deshidratación debida a la poliuria que se presenta en estos pacientes en caso de no consumir la cantidad de líquido suficiente.

Respecto a los resultados obtenidos del análisis clínico, se observa una marcada heterogeneidad de los valores de proteínas plasmáticas de ratas control y diabéticas, en el tiempo y con tratamiento, encontrándose los resultados entre el rango de referencia descrito para ratas Sprague-Dawley 6.0-8.9 g/dl (Taconic®).

TABLA 7. Concentración de proteínas totales en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Proteínas totales (g/dl)			
		CC	CT	DC	DT
Grupo	Tiempo				
	0	7.1 \pm 0.50	7.3 \pm 0.53	7.5 \pm 1.45	7.4 \pm 0.42
	1	7.3 \pm 0.48	7.8 \pm 0.29	7.0 \pm 0.70	7.8 \pm 0.72
	2	6.7 \pm 0.38	7.2 \pm 0.50	7.5 \pm 0.49	7.0 \pm 0.36
	3	7.6 \pm 0.85	6.4 \pm 0.65	8.4 \pm 0.95	7.0 \pm 0.35

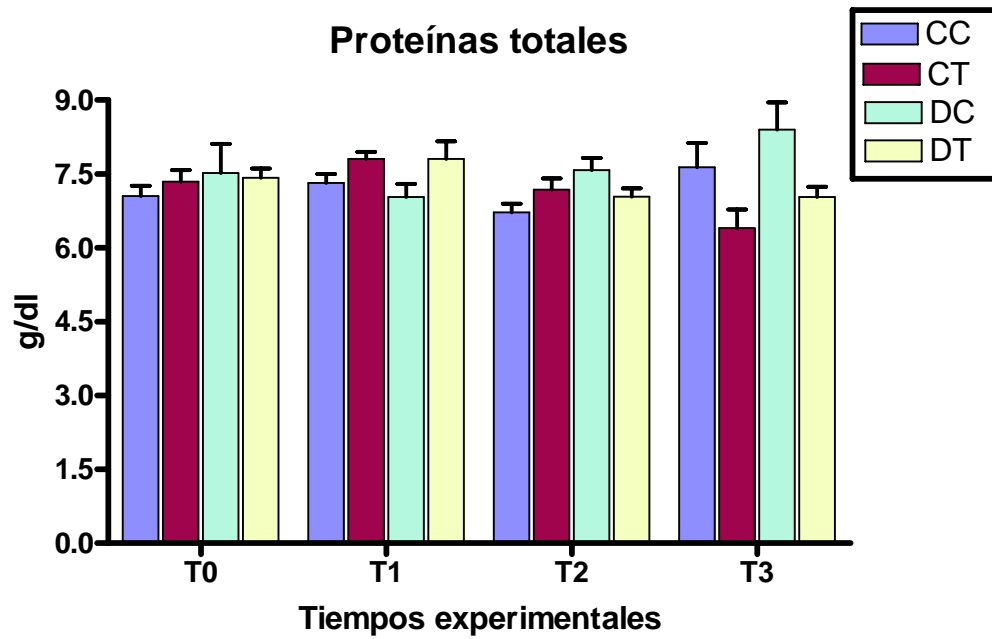


Figura 6. Concentración de proteínas totales en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.2.3. Determinación de albúmina sérica.

La albúmina es el mayor componente proteico del suero. Es sintetizada en el hígado, entre sus funciones se encuentran la mantención de la presión oncótica coloidal normal, aporte de aminoácidos a varios tipos celulares, transporte de diversas sustancias tales como hormonas, vitaminas, etc.

En el caso de pacientes diabéticos, es común que en aquellos que sufren deterioro grave de la función renal, la albúmina plasmática se encuentra disminuida por pérdida de ésta en la orina, motivo por el cual es importante evaluar la presencia de proteínas en la orina de estos pacientes.

Los resultados encontrados respecto a la concentración de albúmina, muestran que los niveles plasmáticos se mantienen constantes durante el transcurso del estudio, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ratas diabéticas y controles, ni tampoco al hacer comparaciones en un tiempo o entre los diferentes tiempos experimentales.

Respecto a los valores obtenidos de los análisis de laboratorio, éstos se encuentran dentro del rango descrito por la bibliografía para ratas Sprague - Dawley de 3.6-3.9 g/dl (Taconic®).

TABLA 8. Albúmina sérica en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Albúmina (g/dl)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	3.3 \pm 0.16	3.1 \pm 0.18	3.4 \pm 0.14	3.3 \pm 0.08	
1	3.3 \pm 0.18	3.5 \pm 0.31	3.4 \pm 0.17	3.5 \pm 0.59	
2	3.5 \pm 0.32	3.7 \pm 0.39	3.4 \pm 0.15	3.2 \pm 0.25	
3	3.7 \pm 0.26	3.4 \pm 0.15	3.7 \pm 0.23	4.2 \pm 0.10	

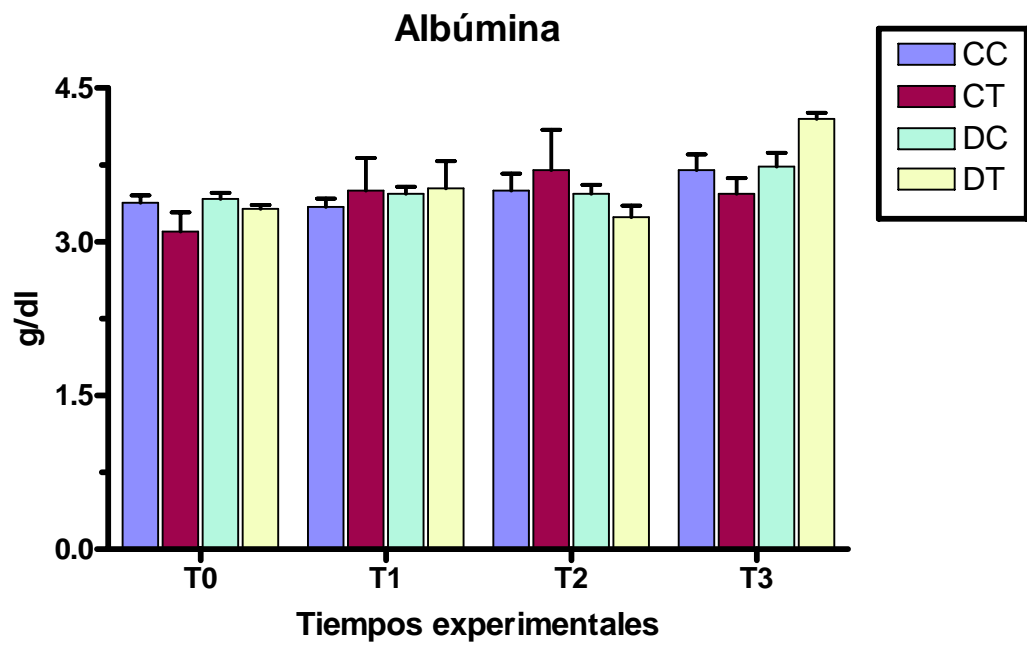


Figura 7. Concentración de albúmina sérica en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.2.4. Determinación de la concentración de colesterol total.

Los valores de colesterol sérico se mantuvieron dentro del rango de referencia establecido para la especie, en la totalidad de los grupos en estudio. Sin embargo, cabe destacar que en el comienzo del tratamiento, los grupos presentaban valores similares de colesterol total, el cual fue variando en el tiempo, aumentando más en ambos grupos no tratados. Sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa en T3 ($p < 0.05$).

TABLA 9. Colesterol total en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo post inducción (promedio \pm DE).

		Colesterol total (mg/dl)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	94.0 \pm 11.3	85.0 \pm 10.5	94.4 \pm 11.1	102.5 \pm 5.4	
1	97.0 \pm 11.5	93.5 \pm 9.7	123.5 \pm 24.2	102.9 \pm 9.4	
2	129.7 \pm 6.6	125.5 \pm 7.8	127.3 \pm 4.7	118.3 \pm 6.3	
3	143.0 \pm 5.6	108.3 \pm 3.1	141.7 \pm 21.6	111.0 \pm 3.0	

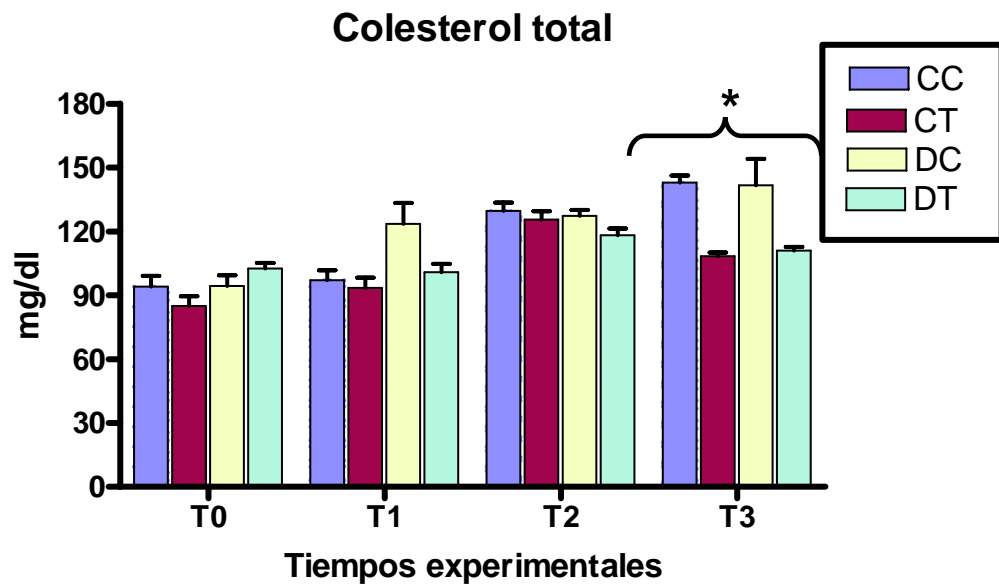


Figura 8. Concentraciones de colesterol total en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). * Indica diferencia estadísticamente significativa.

4.2.5. Determinación de HDL-Colesterol.

La fracción de HDL tiene como función el transporte de colesterol desde tejidos periféricos hacia el hígado para su depuración. Su determinación tiene importancia, ya que concentraciones mayores disminuyen el riesgo de padecer enfermedades cardíacas. Los resultados obtenidos muestran una disminución en el tiempo de HDL-colesterol para todos los grupos experimentales. Además, se puede observar un aumento leve en los valores de ambos grupos de ratas tratadas con el infuso de *L. rivularis*, pero sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados han sido utilizados para calcular la fracción LDL-colesterol.

TABLA 10. Concentración de HDL - colesterol en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		HDL-Colesterol (mg/dl)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	57.2 \pm 6.8	56.2 \pm 3.6	55.3 \pm 5.3	64.7 \pm 8.5	
1	61.2 \pm 4.4	63.8 \pm 9.7	37.0 \pm 7.7	61.7 \pm 11.6	
2	46.0 \pm 2.9	38.8 \pm 2.4	40.3 \pm 3.3	50.0 \pm 4.6	
3	32.0 \pm 3.6	43.3 \pm 3.2	38.6 \pm 1.5	46.7 \pm 4.2	

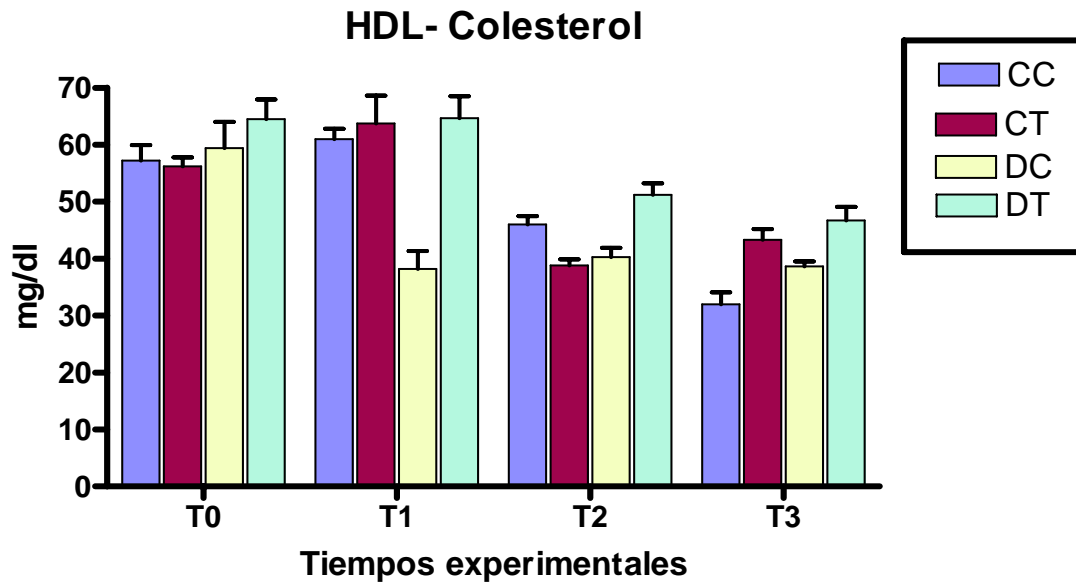


Figura 9. Variación en la concentración de HDL – colesterol en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.2.6. Determinación de triglicéridos en suero.

Los triglicéridos son lípidos que se absorben en la dieta y que además son producidos por el metabolismo de los hidratos de carbono en el organismo. Como su aumento se encuentra relacionado con el riesgo de accidentes vasculares, es común su monitoreo en una serie de enfermedades, entre éstas diabetes. De los resultados obtenidos se puede ver cómo en T0 la concentración de triglicéridos disminuye bruscamente en los grupos de ratas a las cuales se les indujo diabetes. Esta tendencia desaparece en T1, período en el cual no existe diferencia entre los grupos (valor de $p > 0.05$), para terminar con una disminución sorpresiva de la trigliceridemia en todos los grupos, excepto en las ratas CC.

TABLA 11. Concentración plasmática de triglicéridos en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Triglicéridos (mg/dl)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	111.2 \pm 32.9	103.3 \pm 20.9	57.8 \pm 12.9	68.2 \pm 14.0	
1	96.0 \pm 32.0	117.0 \pm 18.3	95.3 \pm 20.6	103.1 \pm 29.8	
2	161.0 \pm 35.1	157.8 \pm 35.9	88.3 \pm 19.0	152.2 \pm 28.8	
3	138.7 \pm 22.6	97.0 \pm 22.6	51.0 \pm 5.6	58.3 \pm 12.9	

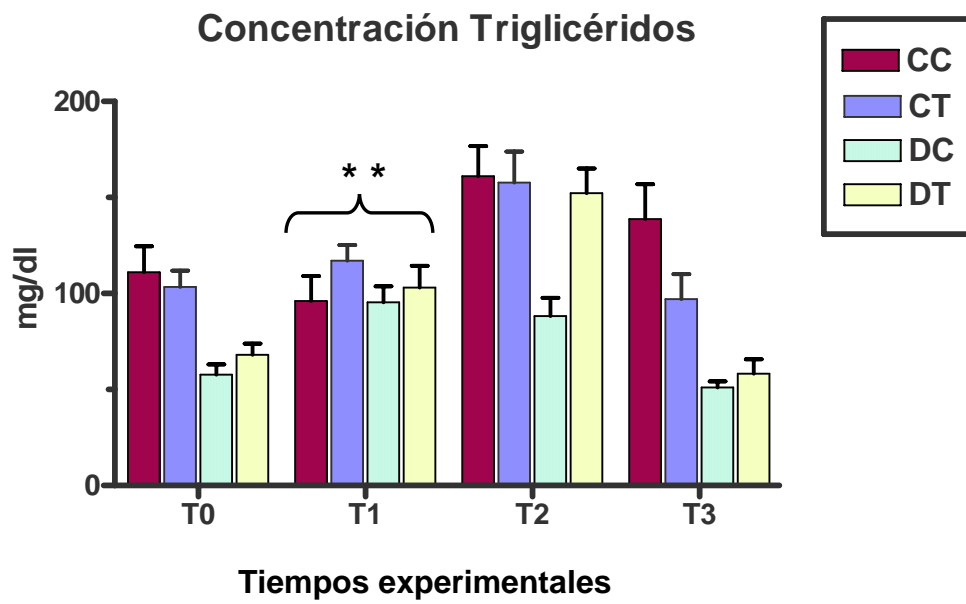


Figura 10. Variación de la concentración de triglicéridos en ratas Controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo post inducción (promedio \pm DE). ** Indica que no existe diferencia estadísticamente significativa.

4.2.7. Determinación de LDL-Colesterol.

La fracción de LDL es el principal mecanismo de transporte del colesterol a las células de tejidos periféricos, entrando a la célula por reconocimiento de receptores específicos de membrana, regulando de esta forma la síntesis de colesterol.

La determinación de la fracción LDL-Colesterol se hace importante ya que aunque el riesgo de enfermedades coronarias está asociado directamente a esta fracción.

Para este fin se ocupó la siguiente fórmula:

$$\text{LDL- Colesterol} = \text{Colesterol Tot.} - \left(\text{HDL-Colesterol} + \frac{\text{Triglicéridos}}{5} \right)$$

De la fórmula anterior se obtuvieron los datos que se presentan a continuación en la tabla 13.

De los resultados mostrados se puede apreciar una marcada reducción de los valores de esta fracción en los tiempos experimentales T2 y T3, en ambos grupos de ratas tratadas con la infusión de la planta. Ambos tiempos experimentales poseen valores con diferencia estadísticamente significativa.

TABLA 12. Concentración de LDL-Colesterol calculados según fórmula matemática en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		LDL-Colesterol (mg/dl)			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	13.8 \pm 1.2	8.8 \pm 0.9	16.6 \pm 0.9	24.1 \pm 1.2	
1	17.5 \pm 1.2	6.7 \pm 0.4	21.7 \pm 1.0	21.6 \pm 0.9	
2	52.5 \pm 2.8	54.0 \pm 6.7	68.8 \pm 2.2	37.3 \pm 3.3	
3	82.7 \pm 3.2	45.8 \pm 2.3	87.6 \pm 4.9	52.6 \pm 2.5	

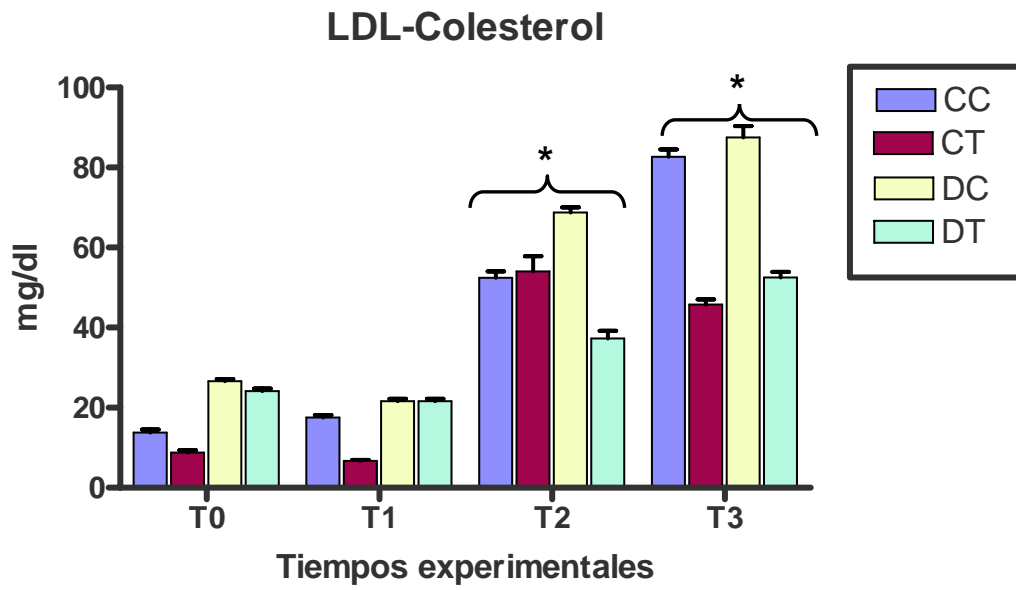


Figura 11. Variación, en el tiempo, de la concentración de LDL-Colesterol en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). * Indica diferencia estadísticamente significativa.

4.2.8. Cálculo del índice aterogénico.

Otra medida utilizada comúnmente por los médicos es el índice aterogénico considerándose de riesgo estándar, índices menores a 5.0.

$$\text{Índice aterogénico} = \frac{\text{Colesterol total}}{\text{HDL- Colesterol}}$$

Los valores obtenidos según la fórmula matemática, reflejan un aumento del índice en los grupos, sin embargo, se observa un menor aumento en los grupos tratados con la infusión de *L. rivularis*.

TABLA 13. Índice aterogénico calculado en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento.

		Índice aterogénico			
Grupo	Tiempo	CC	CT	DC	DT
	0	1.64	1.5	1.71	1.58
	1	1.58	1.46	3.34	1.66
	2	2.52	3.23	3.16	2.37
	3	4.47	2.5	3.67	2.38

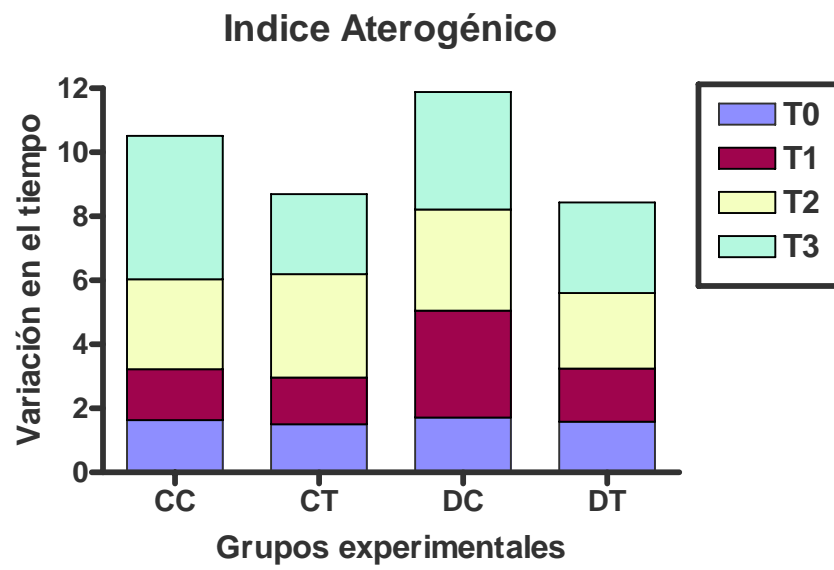


Figura 12. Incremento del índice aterogénico en ratas Controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento.

4.2.9. Determinación de urea sérica

La urea es el producto final mayoritario del metabolismo del nitrógeno proteico en mamíferos, es producida en el hígado y eliminada en la orina, por lo que aporta información de la función hepática así como también del sistema renal.

Se puede apreciar que los valores de urea se mantienen constantes en el tiempo y en cada grupo experimental estudiado. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones plasmáticas entre ratas control y diabéticas tipo II inducidas por Alozano[®].

TABLA 14. Concentración de urea en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Urea mg/dl			
Grupo Tiempo	CC	CT	DC	DT	
0	42.8 \pm 9.3	43.9 \pm 11.2	42.3 \pm 4.5	48.9 \pm 7.5	
1	41.2 \pm 6.6	32.5 \pm 2.8	42.4 \pm 10.5	46.4 \pm 9.7	
2	41.6 \pm 1.9	36.4 \pm 4.7	42.8 \pm 4.8	42.2 \pm 3.1	
3	45.4 \pm 12.0	45.1 \pm 1.9	37.0 \pm 0.8	43.4 \pm 3.7	

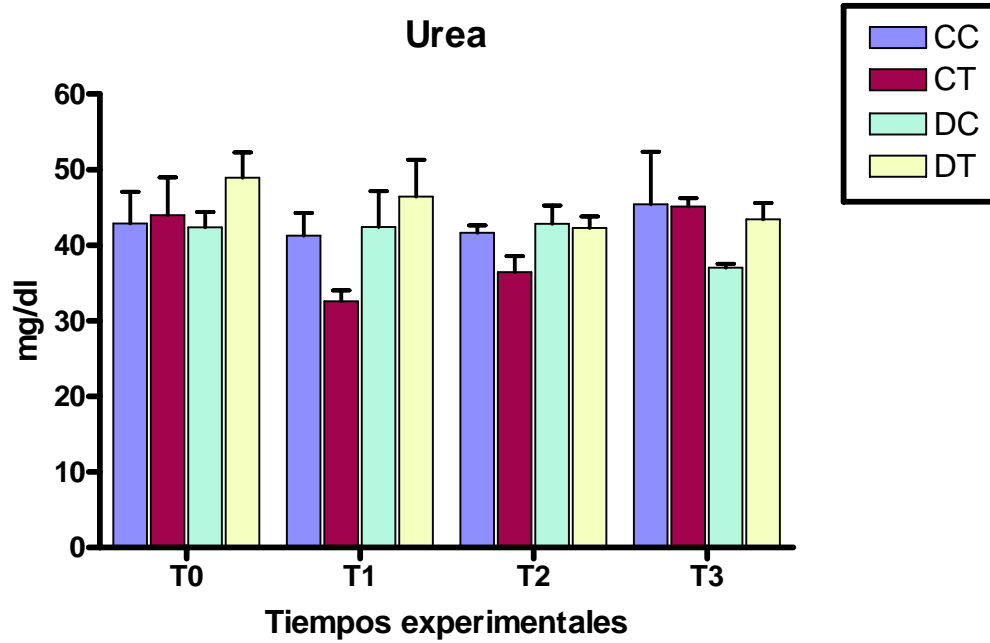


Figura 13. Concentración de urea sérica en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.2.10. Determinación de creatinina sérica.

La creatinina es un producto de desecho que se forma en el músculo, producto de la degradación de fosfo-creatina, en cantidad proporcional a la función y masa muscular. La creatinina es eliminada por filtración glomerular por el riñón.

De los resultados mostrados, se puede evidenciar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre valores obtenidos en los diferentes grupos experimentales en el tiempo, ni por efecto del tratamiento diario con la infusión.

TABLA 15. Concentración de creatinina en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Creatinina mg/dl			
Grupo		CC	CT	DC	DT
Tiempo					
0		0.58 \pm 0.08	0.42 \pm 0.05	0.60 \pm 0.11	0.62 \pm 0.16
1		0.43 \pm 0.19	0.52 \pm 0.20	0.42 \pm 0.15	0.32 \pm 0.10
2		0.62 \pm 0.23	0.42 \pm 0.05	0.52 \pm 0.20	0.62 \pm 0.12
3		0.63 \pm 0.11	0.53 \pm 0.05	0.70 \pm 0.10	0.73 \pm 0.05

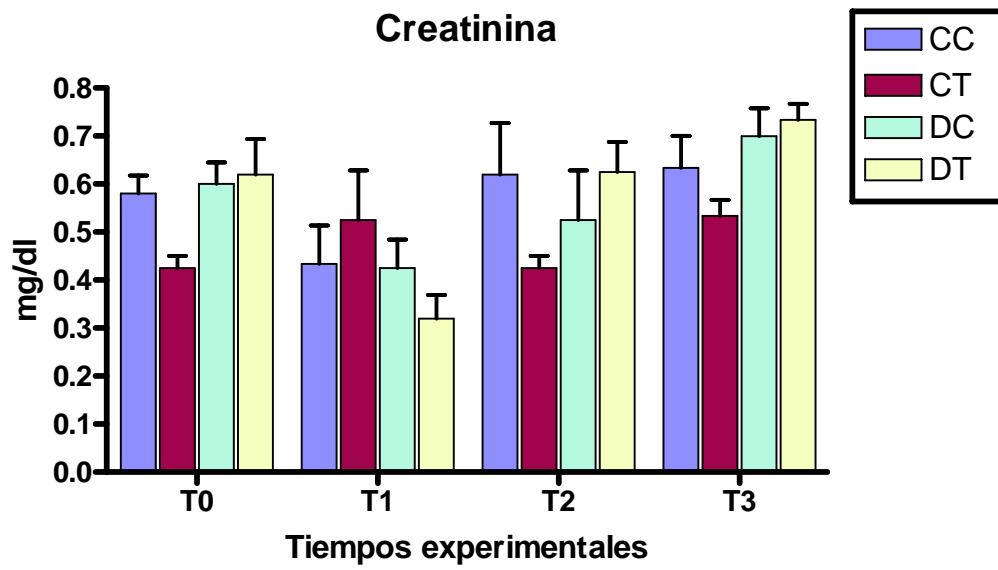


Figura 14. Concentración de creatinina en ratas control y con Diabetes mellitus tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.2.11. Determinación de transaminasas.

Los valores obtenidos en la determinación de transaminasa oxalacética y pirúvica respectivamente, no fueron significativos, probablemente porque fueron procesados en un lapso superior al recomendado comúnmente en la literatura (Henry et al., 1964).

4.2.12. Determinación de Hemoglobina glicosilada.

La medición de proteínas glicosiladas del suero permite conocer el control el estado diabético, debido a que aportan una visión de la concentración de glucosa circulante durante un período determinado por la vida media de las proteínas estudiadas (Romay, 1997). La hemoglobina glicosilada refleja la concentración de glucosa en sangre en un período de 6-8 semanas, aportando datos sobre el control del estado diabético correspondiente a este periodo de tiempo.

En la literatura se encuentran valores de referencia de Hb glicosilada de hasta 7,4%, para ratas Sprague – Dawley (Angulo et al., 1998; Nagisa et al., 2003). Con respecto a este estudio, no se observó un incremento de este parámetro en las ratas diabéticas.

TABLA 16. Porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		HbA1c %			
		CC	CT	DC	DT
Grupo	Tiempo				
	1	4.6 \pm 0.41	3.8 \pm 0.14	5.3 \pm 1.26	4.7 \pm 1.63
	2	3.0 \pm 1.03	2.5 \pm 1.19	4.5 \pm 1.43	3.1 \pm 1.42
	3	2.6 \pm 0.37	2.2 \pm 0.82	2.9 \pm 1.40	2.1 \pm 0.66

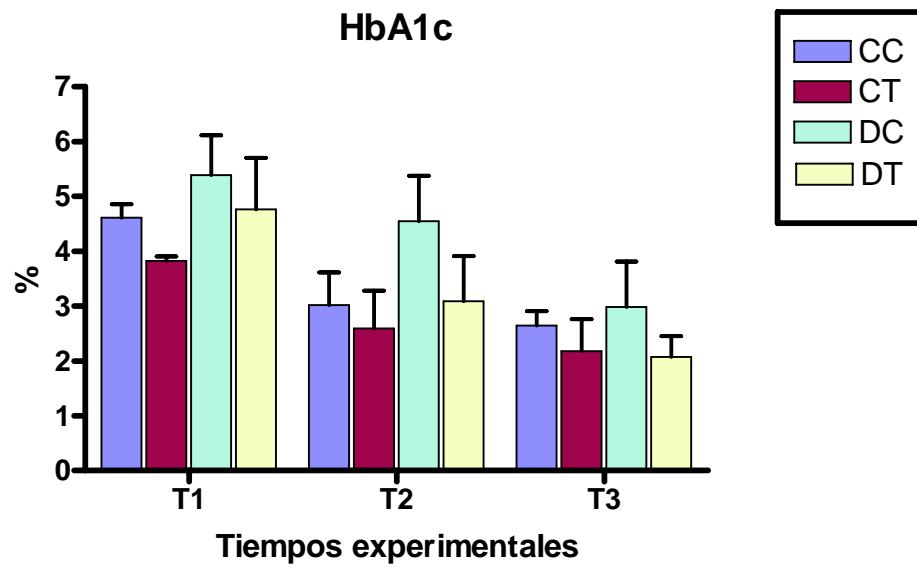


Figura 15. Porcentaje de hemoglobina glicosilada en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.2.13. Peroxidación lipídica en plasma.

Los resultados obtenidos en esta determinación muestran cómo varía la concentración de LP en los grupos durante los tiempos experimentales. Los resultados obtenidos muestran que en T1 no existe diferencia entre los valores obtenidos para los distintos grupos experimentales, sin embargo, a partir de T2 se aprecia diferencia estadísticamente significativa. Además se observa el rápido aumento en los niveles de LP alcanzado para el grupo diabético control.

TABLA 17. Niveles de lipoperoxidación lipídica en plasma, expresados en $\mu\text{moles/L}$ de TBARs en ratas control y con Diabetes mellitus tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Lipoperoxidación lipídica ($\mu\text{moles/L}$)			
Grupo		CC	CT	DC	DT
Tiempo					
1		2.8 \pm 0.3	2.2 \pm 1.5	2.4 \pm 1.6	2.0 \pm 0.8
2		1.6 \pm 0.8	0.5 \pm 0.18	3.5 \pm 0.7	0.13 \pm 0.06
3		3.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	9.4 \pm 1.2	0.13 \pm 0.06

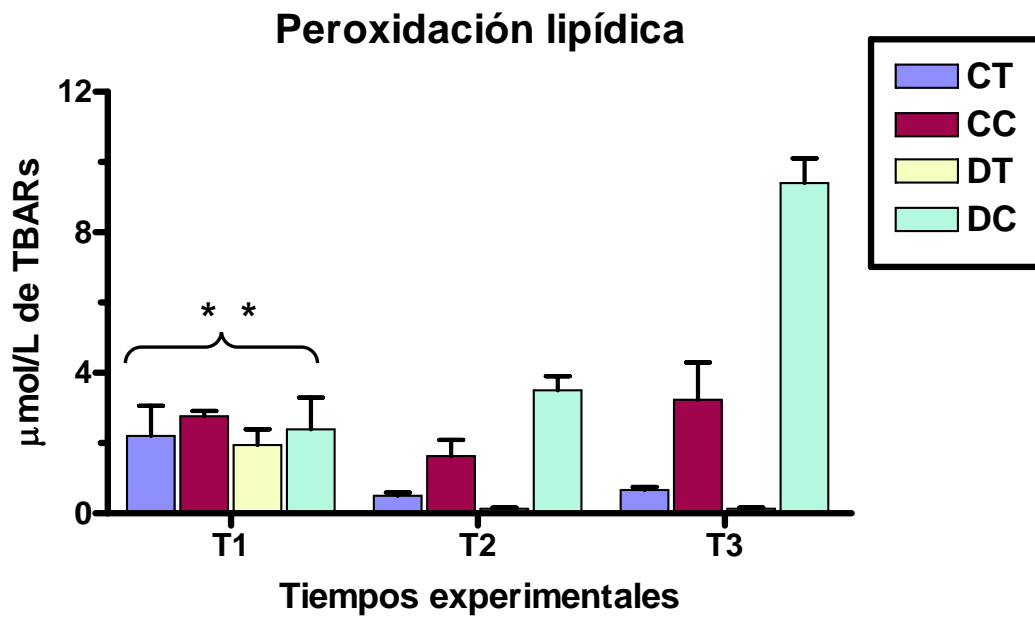


Figura 16. Variación de la concentración de peroxidación lipídica determinada en plasma de ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE). * * Indica que no existe diferencia estadísticamente significativa.

4.2.14. Test de tolerancia oral a la glucosa.

La prueba de tolerancia a la glucosa por años se ha tratado de establecer como una prueba diagnóstica tanto del estado pre-diabético, como del diabético. Se establece el estado de intolerancia a la glucosa cuando uno o más de los valores obtenidos en alguno de los tiempos, es mayor a 200 mg/dl.

Los valores obtenidos para este estudio corresponden a cinco semanas de tratamiento con el infuso de la planta. Se observa una disminución de tolerancia a la glucosa para ambos grupos diabéticos, con una menor la tolerancia de las ratas diabéticas control ($p < 0.05$). Un resultado inesperado es el hecho de que en todos los grupos tratados con el infuso ya sea en dosis diarias, así como administrado *in situ* se observan picos mayores que en las ratas del grupo CC.

TABLA 18. Test de tolerancia oral a la glucosa en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano®.

		Glucosa (mg/dl)				
Grupo Tiempo	CC	CC trat <i>in situ</i>	CT	DC	DT	
0 min	80.0 ± 3.6	87.6 ± 4.5	89.0 ± 8.0	239.8±133.6	128.8.8±11.8	
30 min	139.0 ± 15.7	177.3 ± 9.3	152.3 ± 33.5	493.3±144.9	264.6 ±42.6	
60 min	122.3 ± 8.7	185.3 ± 5.8	154.3 ± 27.2	447.3±124.1	268.7 ±108.6	
120 min	92.0 ± 8.2	107.3 ± 5.0	108.3 ± 11.4	318.0±136.6	167.7±102.7	
180 min	94.7 ± 5.1	100.3 ± 1.5	110.8 ± 27.3	219.0±125.4	109.3 ±14.7	

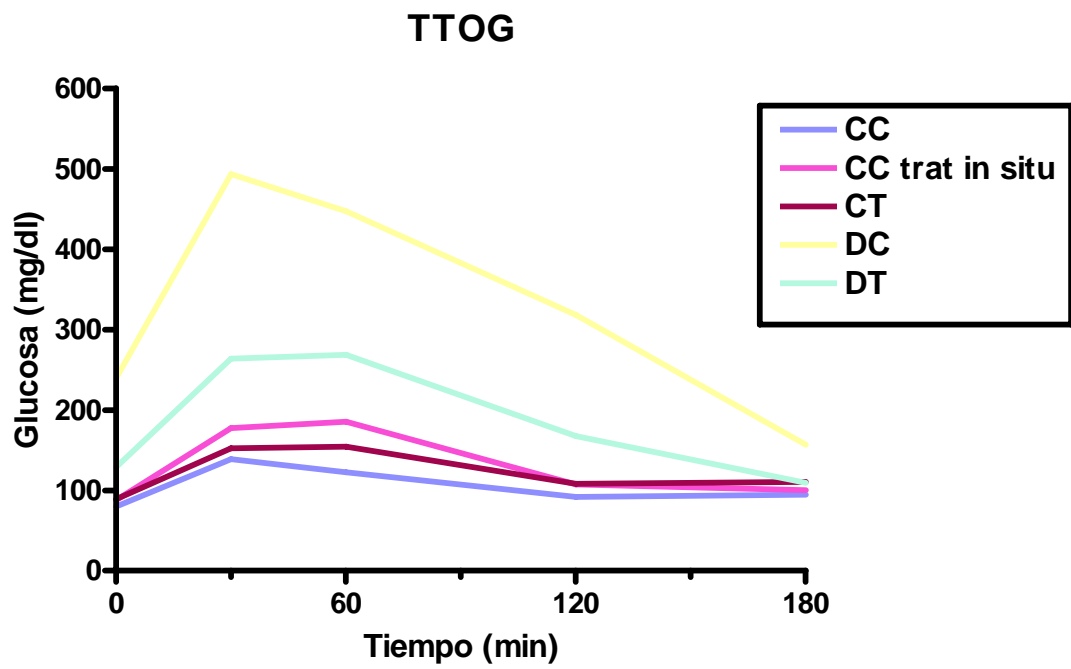


Figura 17. Test de tolerancia oral a la glucosa en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano®.

4.3. Evaluación microscópica.

En el estudio histopatológico del páncreas se presenta el número promedio de islotes de Langerhans/10 campos microscópicos a un aumento 4x para cada grupo experimental, según el tiempo de tratamiento.

Al comparar los grupos CC y CT se observan diferencias en T1 las que se mantienen a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Sin embargo, no existe diferencia entre los grupos diabéticos, mostrándose una reducción similar en el número de islotes respecto al grupo control, lo que indica la eficiencia en la inducción de diabetes. El análisis estadístico de los datos mostró diferencias ($P < 0,05$) entre todos los grupos, a excepción de los grupos diabéticos.

TABLA 19. Número promedio de islotes de Langerhans por grupo, en 10 campos (4x), en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según

		Número promedio de islotes de Langerhans			
Grupo		CC (n=3)	CT (n=3)	DC(n=3)	DT(n=3)
Tiempo					
1		6.9	7.9	3.4	3.9
2		6.4	8.5	3.7	3.6
3		6.5	8.1	3.6	4.2

tiempo de tratamiento.

4.3.1. Lesiones microscópicas en páncreas.

En los páncreas de las ratas con diabetes se observó depleción celular y fibrosis de los islotes de Langerhans. Esta última condición se hizo más evidente en los grupos con mayor tiempo de inducción. Por otra parte, se observó proliferación de conductos pancreáticos. Cabe señalar que no se apreciaron diferencias en los tipos e intensidad de las lesiones entre los grupos control y diabéticos a distintos tiempos.

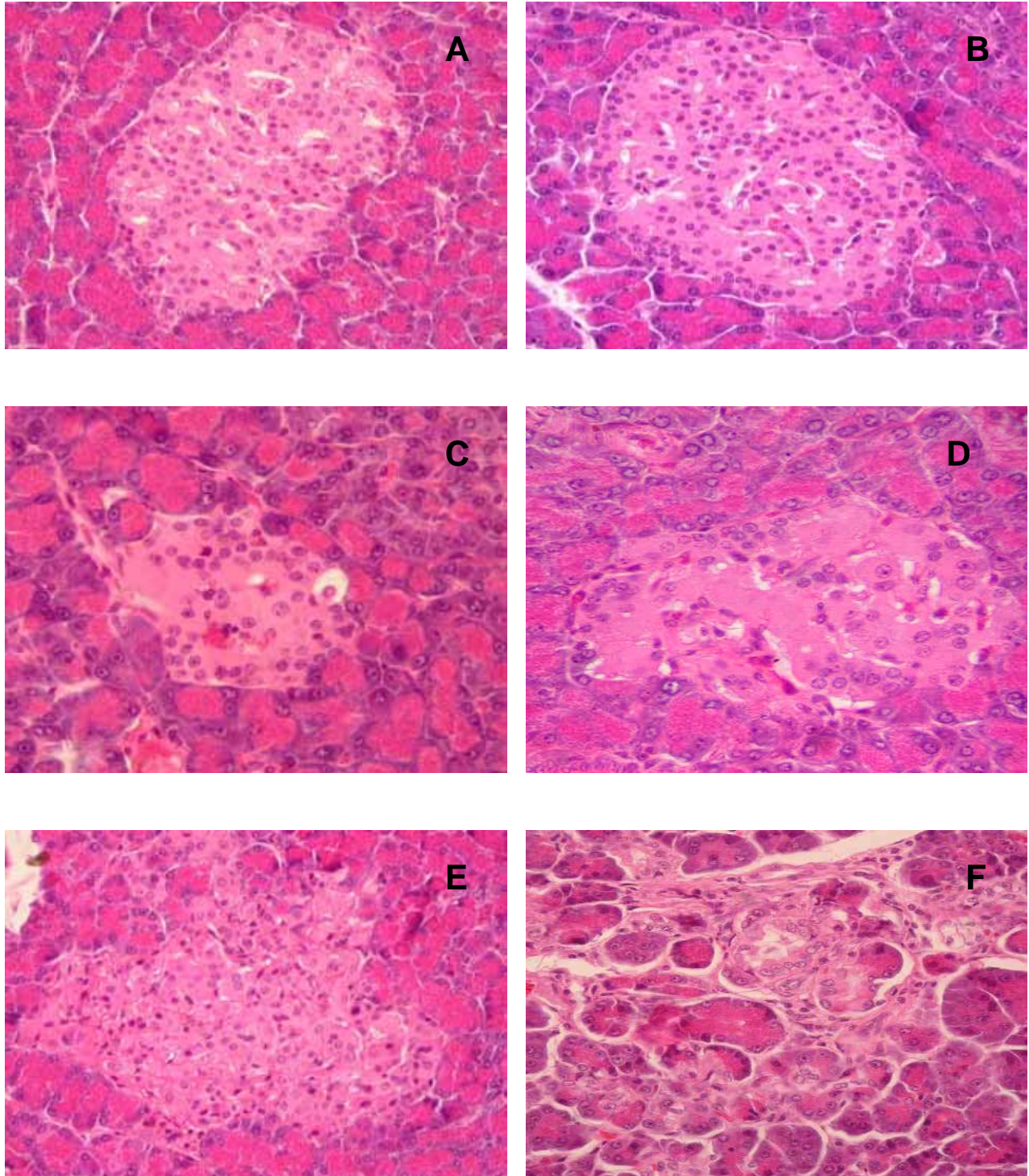


Figura 18. Islotes de Langerhans H/E. Aumento: 400x. **A:** Rata grupo CC. T2. **B:** rata grupo CT. T2. **C:** Depleción celular. Rata grupo DC. T2. **D:** Depleción celular. Rata grupo DT. T2. **E:** Fibrosis en islote de Langerhans. Rata DC. T3 **F:** Proliferación de conductos pancreáticos en rata DT. T3.

4.4. Inmunohistoquímica (IHQ) y estudio morfométrico.

Al hacer una comparación en relación con el área total de los islotes de Langerhans correspondientes al tejido endocrino se observó una disminución de aproximadamente un 75% en ambos grupos diabéticos respecto a los grupos controles. Existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos diabéticos control y tratados. A continuación se presentan los resultados correspondientes al área total de tejido endocrino (μm^2) en páncreas en los cuatro grupos experimentales.

TABLA 20. Área promedio de los islotes de Langerhans (μm^2) en ratas controles y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

		Area (μm^2)			
		CC (n=3)	CT (n=3)	DC (n=3)	DT (n=3)
Grupo	Tiempo				
	1	20422 \pm 5184	20307 \pm 2140	5322 \pm 308.3	5712 \pm 5102
	2	21008 \pm 4753	20116 \pm 2457	5130 \pm 1211	5570 \pm 692.6
	3	20281 \pm 2829	19892 \pm 3627	5129 \pm 1326	5332 \pm 1289

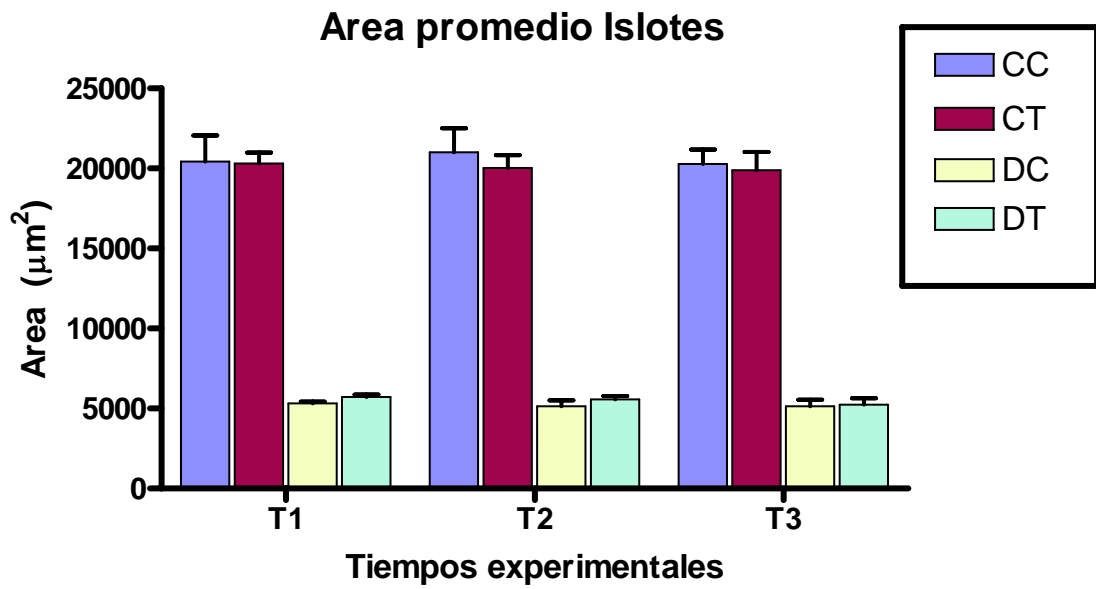


Figura 19. Variación en el área de los islotes de Langerhans en grupos de ratas con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento (promedio \pm DE).

4.4.1. Área inmunomarcada en islotes de Langerhans.

El análisis estadístico del área inmunomarcada (AIM) reveló diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos control y diabético, en los tres períodos de tiempo que consideró el estudio. De igual modo, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre ambos grupos de ratas con Diabetes (con y sin tratamiento), a través del tiempo, encontrándose una mayor concentración de insulina en los islotes de ratas tratadas.

Cabe señalar que la extensión de área inmunomarcada se mantuvo constante para cada grupo, independiente del tiempo experimental.

TABLA 21. Área inmunomarcada \pm D.E. (%) en islotes de Langerhans en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Alozano[®], según tiempo de tratamiento.

		Porcentaje AIM			
Grupo Tiempo	CC (n=3)	CT (n=3)	DC (n=3)	DT (n=3)	
1	64.2 \pm 0.078	62.3 \pm 0.028	16.9 \pm 0.025	23.5 \pm 0.018	
2	64.2 \pm 0.048	62.3 \pm 0.031	17.6 \pm 0.046	21.3 \pm 0.006	
3	62.2 \pm 0.050	60.4 \pm 0.0005	17.8 \pm 0.037	23.2 \pm 0.001	

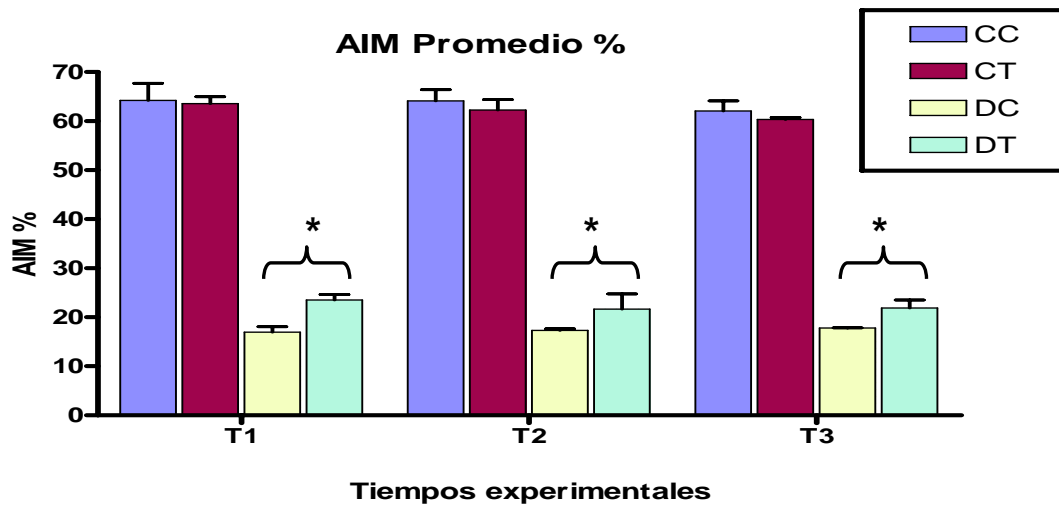


Figura 20. Área inmunomarcada de los islotes de Langerhans en ratas control y con Diabetes mellitus Tipo II inducida con Aloxano[®], según tiempo de tratamiento. (promedio \pm DE). * Indica diferencia estadísticamente significativa.

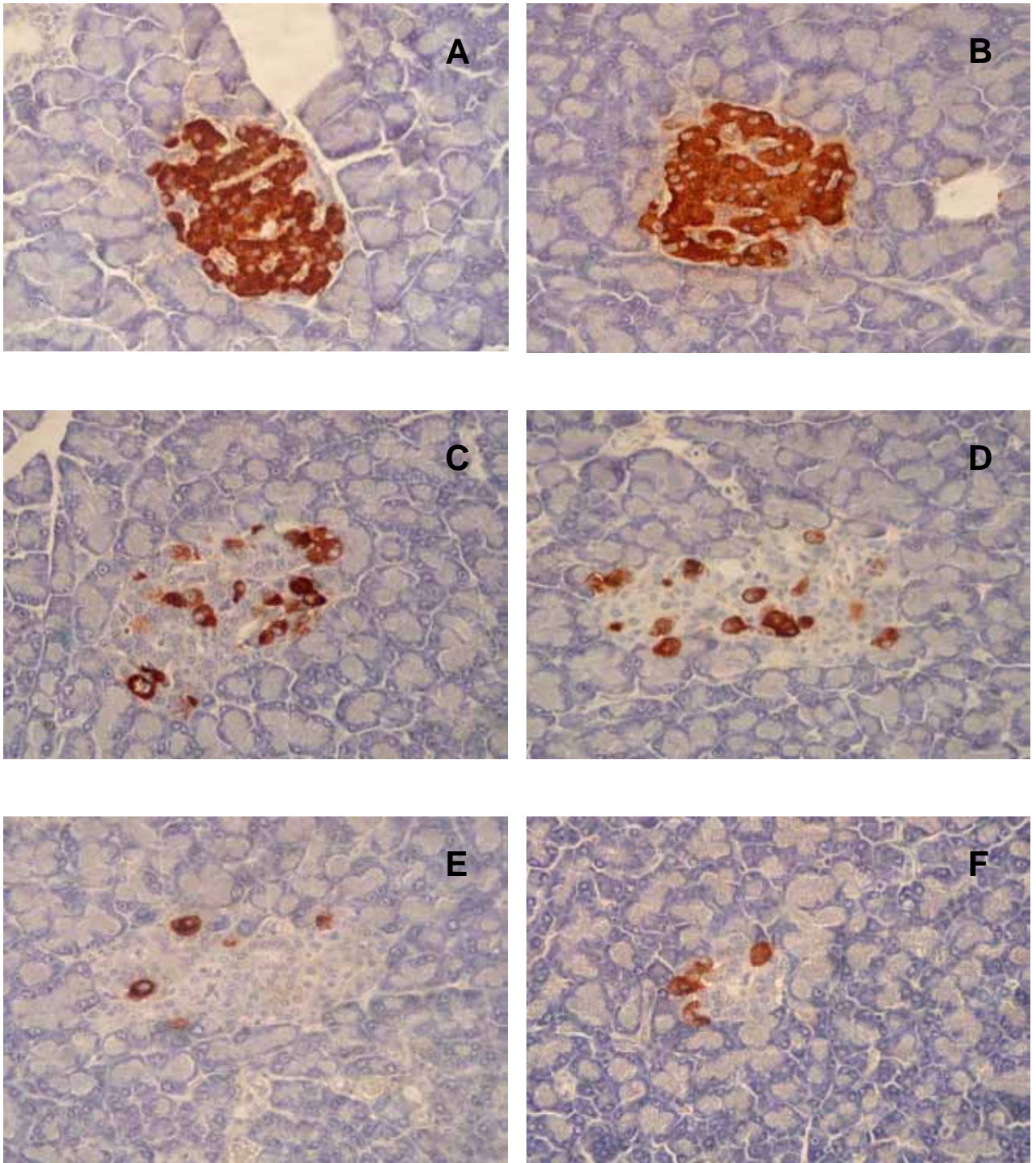


Figura 21. Células β inmunopositivas en islote de Langerhans. Streptavidina-Peroxidasa. **A:** Páncreas de rata CC. Para T2. **B:** Páncreas de rata CT. Para T2. **C:** Páncreas de rata DT. Para T2. **D:** Páncreas de rata DT. Para T3. **E:** Páncreas de rata grupo DC. T2. **F:** Páncreas de rata grupo DC. T3. Aumento 400 x.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Inducción de NIDDM.

El modelo de Diabetes mellitus tipo II inducido por Alozano®, se caracterizó por una disminución del número de islotes de Langerhans, asociado a una reducción de la concentración de insulina pancreática, un aumento moderado de la glicemia basal (en ayunas), y una tolerancia disminuida a la glucosa. Lo anterior se correlaciona con otros modelos animales utilizados para el estudio de esta patología, y con los síntomas encontrados en humanos. Además se presenta un retraso del crecimiento, polidipsia, poliuria y polifagia (Masiello et al., 1998).

Muchos grupos de investigación dudan acerca de la verdadera utilidad de los estudios realizados en modelos de animales experimentales, como en este caso roedores, ya que existen importantes diferencias entre estas especies y humanos. Sin embargo, es importante reconocer que estos estudios nos pueden aportar algunas claves aún desconocidas sobre la etiología de la enfermedad, su control en el tiempo y posibilidades de tratamiento (De Vos et al., 1995), y por otra parte, se debe tener presente la imposibilidad de realizar estudios en humanos, necesarios para la comprensión de procesos *in vivo* (Pipeleers et al., 2001).

5.2. Estudio de laboratorio clínico.

Desde el análisis del gráfico de glicemia, figura 5, se puede inferir que el infuso de *L. rivularis* muestra una positiva actividad hipoglicemiante desde los inicios del tratamiento, alcanzando en el T3, resultados sin diferencia estadística entre los grupos CC, CT y DT. Esto demuestra que el infuso actúa propendiendo a alcanzar niveles normales de glicemia, en contraste con otros estudios donde aún cuando se

muestra efecto antidiabético, no se tiende a la normalidad (Attele et al., 2002; Eshrat et al., 2002). Otro punto que cabe destacar, es que las ratas Control Tratadas no presentaron signos de hipoglicemia.

La concentración sérica de proteínas totales y de albúmina, está regulada por el balance entre la síntesis hepática y el catabolismo en el endotelio vascular de capilares del sistema circulatorio. La concentración sérica de estas proteínas se encuentra alterada en una serie de patologías, siendo las de mayor importancia las de tipo hepático, renal y proliferaciones celulares malignas. (Zilva et al., 1988). En el estado diabético no controlado, es común encontrar una disminución de ambos parámetros clínicos, causados por una disminución en la síntesis a nivel hepático de proteínas y por pérdida a nivel renal, fundamentalmente de albúmina, debido a los distintos tipos de nefropatías diabéticas (Lawrence y Pesce, 1996).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en los valores de proteínas totales y albúmina séricas, es importante resaltar que en tratamientos hipoglicemiantes con insulina y glibenclamida, se observa una elevación principalmente de albúmina, aparentemente debido a un efecto anabólico (Mahdi et al., 2003), por lo que se puede descartar un mecanismo de acción hipoglicemiante de este tipo de *L. rivularis*.

La evaluación de los resultados obtenidos en la determinación de colesterol total reveló que la infusión de la planta, suministrada en dosis diarias, ejerce un efecto hipocolesterolémico en el tiempo. En el perfil lipídico, además se incluyen los valores de HDL-colesterol, LDL-colesterol, Triglicéridos e índice aterogénico, a modo de

tener un escenario general de lo ocurrido con el metabolismo de colesterol y ácidos grasos. Según los datos obtenidos en este trabajo, podemos ver varios aspectos interesantes de analizar. Lo normal sería esperar que en los grupos de animales diabéticos, las concentraciones de colesterol total aumenten a medida que transcurre el tiempo de evolución de la enfermedad, lo cual no ocurre en el caso de las ratas Diabéticas Tratadas. Por el contrario, se observa un incremento en las ratas del grupo Control Control y Diabéticas Control, lo que puede atribuirse a un factor propio relacionado con el envejecimiento del animal modelo. Por otra parte, al comienzo del tratamiento, las ratas mostraban valores similares de HDL-colesterol, los cuales disminuyeron en ambos grupos control al final del tratamiento (Figura 7).

Los triglicéridos son aportados por la dieta y el metabolismo de hidratos de carbono. En ratas diabéticas, al T0, la trigliceridemia es considerablemente más baja que en el caso de los controles, aumenta en el tiempo, para descender nuevamente en T3. Debido a que la diabetes es una enfermedad del metabolismo de carbohidratos, no existe un aporte de ellos a la concentración sanguínea. Por lo que aún cuando se encuentra una importante variación en la concentración de triglicéridos el amplio rango de referencia en ratas (≤ 150 mg/dl) estos valores pueden ser considerados normales. LDL-colesterol e IA son los indicadores de riesgo de padecer enfermedades coronarias y aterosclerosis más ampliamente usados; valores elevados de éstos, son sinónimo de mayor riesgo aterogénico, por lo que es posible evaluar como beneficioso el efecto de la administración del infuso al disminuir los valores séricos de estos parámetros.

La aterosclerosis, es considerada una enfermedad crónica de las arterias de naturaleza multifactorial que se caracteriza por endurecimiento, deformidad y

fragilidad de sus paredes, consecutiva al depósito de diferentes sustancias en las tunicas arteriales. En la formación de la placa de ateroma se interrelacionan varios factores, unos de carácter local y otros sistémicos como la hipertensión arterial, la obesidad, el sedentarismo, el hábito de fumar y estrés (Weissberg, 2000), todos ellos compartidos con diabetes mellitus, por lo que la aterosclerosis está presente en la gran mayoría de los diabéticos.

La hipercolesterolemia mantenida favorece la respuesta vasoconstrictora periférica al disminuir la producción y aumentar el catabolismo de óxido nítrico endotelial, que produce no sólo daño endotelial, sino también oxidación lipídica de la placa ateromatosa (Roche, 2000; Brown, 2000), aportando también de esta forma a la concentración de lipoperóxidos circulantes. Por este motivo parece interesante, aún cuando no son exámenes de laboratorio clínico de rutina, los valores obtenidos en la determinación de peroxidación lipídica, expresados como especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (Estepa et al, 2001), en las ratas tratadas con el infuso se observó una clara disminución de la concentración de lipoperóxidos especialmente las ratas DT respecto al grupo CC y DC, datos que ratifican el efecto de la planta sobre las diferentes fracciones lipídicas antes mencionadas, pronosticando un efectivo tratamiento para controlar el problema de las dislipidemias y previniendo las complicaciones cardiovasculares asociadas al 97% de los pacientes con diabetes tipo II, daño que empeora con el transcurso del tiempo por el estrés oxidativo asociado (Henry, 2001).

El valor de las concentraciones de urea y creatinina son parámetros utilizados para la evaluación de función renal y seguimiento de diversas nefropatías de tipo glomerular y tubular (Zilva et al, 1988).

En el presente trabajo se pueden observar valores similares de estos parámetros en todos los grupos estudiados, aún cuando las ratas DC presentaban una evidente poliuria, no aumentó la concentración plasmática de creatinina y urea. Lo anterior indicaría que no existe daño renal de importancia.

El TTOG es un procedimiento originalmente desarrollado para clasificar la tolerancia a los hidratos de carbono, debido a que la respuesta de insulina y de glucosa plasmática durante este test, refleja la habilidad de las células β del páncreas para secretar insulina y la sensibilidad de los tejidos a esta hormona, por esta razón se ha usado ampliamente para evaluar la función de estas células y la resistencia a insulina (Stumvoll et al, 2000). En el presente estudio se pudo observar cómo el infuso de la planta actúa modificando la respuesta, después de administrar una alta carga de glucosa (2g/kg de peso) en ratas Diabéticas Tratadas, mostrando una mejor respuesta en la tolerancia, lo que se podría deber a una restauración de la respuesta periférica a insulina o a una inhibición en la captación intestinal de glucosa de acuerdo a lo propuesto por Bajaj et al. (Bajaj et al., 1999), así como a una mayor producción de insulina por parte de las células β del páncreas. Otro punto a considerar es la diferencia encontrada entre los distintos grupos controles donde el tratamiento mostró una menor tolerancia a la glucosa, por lo que de estos datos se puede pensar en un mecanismo aún desconocido a nivel de receptores, lo que sería motivo para continuar estudios futuros.

5.3. Estudio microscópico, IHQ y morfometría.

Alrededor del 3-5% de la masa total del páncreas está constituida por islotes de Langerhans, que contienen en su interior células con función endocrina. En islotes sanos las células β alcanzan un porcentaje entre 60-80%, cantidad variable entre individuos y especies, distribuidos de forma predeterminada y en mayor número en la zona anatómica denominada cola del páncreas (Clark et al., 2001). Sin embargo, la localización de los islotes es adyacente a los conductos pancreáticos, por su formación a partir de células precursoras que se diferencian durante el desarrollo fetal, capacidad que se pierde durante la etapa adulta, originando tasas muy bajas de recambio (Boner-Weir et al., 1993).

Se ha reportado que en ratas diabéticas existe una mayor proliferación de células provenientes desde los conductos pancreáticos, originando pequeñas agrupaciones de células β adyacentes a los conductos (Rooman et al., 2002; Bock et al., 2003). Esta tendencia también se observó en este estudio, con una mayor expresión en ratas diabéticas tratadas, comparadas con el grupo DC, pero sin tinción positiva para insulina, lo que podría indicar células aún inmaduras no capaces de producir insulina, que puede verificarse con estudios de mayor tiempo de duración (Figura 18).

Los grupos diabéticos exhibieron una severa degeneración de los islotes presentando lesiones principalmente de fibrosis, depleción de células endocrinas, reducción en el número y tamaño de los islotes (Figura 18), y disminución de células inmunoreactivas para insulina (Figura 21), lo que muestra que, a pesar de existir una

falla a nivel estructural, se mantiene la función de las células β sanas remanentes; como ha sido mencionado en otros estudios (Koyama et al., 1998). Sin embargo, los datos experimentales obtenidos en este trabajo, no reflejaron hipertrofia de células β ni tampoco de islotes, lo que normalmente se describe en la literatura cuando la cantidad de insulina producida no alcanza para los requerimientos metabólicos (Bock et al., 2003). En este trabajo se observó alrededor de un 75% de reducción del tamaño de los islotes, en ratas diabéticas (Figura 19).

Es de importancia señalar que el tratamiento con *Leptocarpha rivularis* no afectó el aspecto morfológico ni el tamaño de los islotes pancreáticos en los grupos Control Tratados ni en el grupo de ratas Diabéticas Tratadas, observándose la misma distribución de los gránulos de insulina respecto al grupo CC. La cantidad de gránulos de insulina, si bien se encuentra disminuida en ratas Diabéticas Tratadas, esta distribución es homogénea, a diferencia de las ratas Diabéticas sin tratamiento, en las que la disminución de gránulos fue dramática y con una distribución periférica en los islotes (Figura 21).

Aún cuando el grupo Diabético Tratado presentó un aumento en AIM (Figura 20), no es posible afirmar que el infuso de la planta estimule la producción y/o secreción de insulina, debido a que a las ratas Control que se les administró el tratamiento presentaron glicemias normales, no observándose cuadros de hipoglicemia, como ha sido reportado para este mecanismo de acción (Kuntz et al., 2004). Lo que podría conducir a investigaciones sobre el efecto como tratamiento para Diabetes tipo I del infuso de la planta en estudio.

Otra interrogante que surge a partir de los resultados obtenidos es responder si el aumento de insulina encontrado por inmunohistoquímica en ratas DT respecto a las DC, será capaz de regular la concentración de glucosa plasmática, incógnita también planteada por Rabinovitch (Rabinovitch et al., 1996). Es importante analizar aspectos hasta ahora poco claros sobre cantidad de insulina y la relación que existe entre la masa de los islotes según las necesidades de cada individuo respecto a su masa corporal (Ho Yoon et al., 2004). Además, una de las desventajas de la técnica de IHQ es el hecho de que sólo mide la cantidad de insulina presente en el islote en el momento de tomada la muestra y no permite medir la cantidad de insulina secretada en el tiempo (Bock et al., 2003). A esto se podrían agregar los datos de Rasthogi et al. (Rasthogi et al., 1990), quienes encontraron, en perros, una reducción de hasta un 70% de células β ; pero la cantidad diaria de insulina producida, sólo disminuía en un 50%.

Otro punto a considerar son los datos, aunque escasos, de Peroxidación Lipídica, donde como se comentó anteriormente, se ve una drástica reducción en los contenidos de estas especies. Considerando la capacidad de los radicales libres de interactuar con lípidos séricos, dando como principales productos de degradación aldehidos, en especial malonaldehido. Se debe tomar en cuenta que concentraciones elevadas de MDA inhiben, a nivel celular, la síntesis de insulina (Laybutt et al., 2002). Como la composición del infuso de la planta es, en parte desconocida, también se puede considerar efectos mediadores por esta vía, ya que la mayoría de las vegetales poseen metabolitos de acción antioxidante. Pero el efecto mostrado no es solamente atribuible a esta propiedad, ya que existen estudios que demuestran el efecto hipoglicemiante de algunos tipos de sesquiterpenos (Inman et al., 1999), pudiendo ser el caso de *L. rivularis*, que posee

entre sus metabolitos, la lactona sesquiterpénica conocida como Leptocarpina (Martinez et al., 1979, 1995, 2000).

Con los resultados obtenidos se hace interesante una investigación orientada a dilucidar el mecanismo de acción de la infusión, tratando de identificar él o los compuestos responsables de las actividades biológicas encontradas. Además es importante considerar estudios orientados a buscar una relación dosis–respuesta para el tratamiento con la infusión de la planta.

6. CONCLUSIONES

- La inducción de Diabetes tipo II con Aloxano es un buen modelo para el estudio de esta patología, ya que se encuentran presentes tanto los signos clínicos, parámetros de laboratorio y anatomopatológicos descritos por la literatura tradicional.
- Los hallazgos microscópicos de IHQ y morfometría, muestran la disminución del número de islotes de Langerhans en alrededor de 75%, lo que concuerda con la descripción de la patología de NIMMD. Además se confirmó por la disminución en la cantidad de insulina detectada en ratas diabéticas.
- Se demostró que la infusión de *Leptocarpha rivularis* es una alternativa para el control de la hiperglicemia e hipercolesterolemia, características de la NIDDM, sin efectos indeseados y sin alterar estos parámetros en sujetos sanos.
- Los análisis realizados de AIM muestran un aumento en la cantidad de insulina presente en islotes de Langerhans de ratas Diabéticas Tratadas con la infusión. Sin embargo, no es posible determinar si esta cantidad es suficiente para el control del estado de hiperglicemia encontrado en ratas diabéticas.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Alarcón- Aguilar F.J., Jiménez –estrada M., Reyes-Chilpa R., Gonzales-Paredes B., Contreras-Weber C., Roman-Ramos R. (2000). Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol*, **69**: 207-215.

Angulo J., Rodríguez-Manas L., Peiro C., Neira M., Marín J., Sánchez-Ferrer CF. (1998). Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharmacol*, **358** :529-37

Atkinson MA., Maclaren N. (1994). The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, **331**:1428-36.

Attele A., Zhou Y., Xie J., Wu J., Zhang L., Dey L., Pugh W., Rue P., Polonsky K., Yuan C. (2002). Antidiabetic effects of Panax ginseng Berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, **51**: 1851- 1858.

Bajaj S., Srinivasan B.P. (1999). Investigation into the Antidiabetic activity of *Azadirachta indica*. *Indian J Pharmacol*, **31**: 138-141.

Banerjee S., Sinharoy K., Singh AK. (2002). Oral hypoglycaemic Failature. *JIMA*, **100**: 1-7

Bock T., Pakkenberg B., Buschard K. (2003). Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice. *Diabetes*, **53**: 1716-1722.

Boner-Wier S., Baxter LA., Schuppin GT., Smith FE. (1993). A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*, **43**: 1715-1720.

Brown WV. (2000). The benefit of aggressive lipid lowering. *Atheroscler Suppl*, **1**: 15-19.

Brownlee M. (1992) Nonenzymatic glycosylation of macromolecules: prospects of pharmacologic modulation. *Diabetes*, **141**:S57-60.

Chastain CB, Ganjman VK. (1990) Endocrinología clínica de los animales de compañía. Editorial Inter-Vet., Buenos Aires.

Committee Report: Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus (2003). *Diabetes Care*, **26**: 3160-3167.

Clark A., Jones L., de Koning E., Hansen B., Matthews D. (2001). Decreased Insulin Secretion in Type 2 Diabetes: A Problem of Cellular Mass or Function? *Diabetes*, **50**:S169-171.

Clapes S., Torres O., Companioni M., Villariño U., Broches F., Cespedes E. (2001). Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed*, **20**:93-98.

Crawford JM., Cotran RS. (2000). El páncreas. En: Robbins: Patología estructural y funcional: 951-966. 6ª edición. Editorial Mcgraw-Hill/Interamericana, Madrid.

De Vos A., Heimberg H., Quartier E., Huypens P., Bouwens L., Pipeleers D., and Schuit F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest*, **96**: 2489–2495.

Edlund H. (2001). B-Cell Differentiation and growth. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes*, **50**: S5-9.

Eshart H., Hussain A. (2002). Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of Curcumin from *Curcuma longa*, Linn, and partially purified product from *Abroma augusta*, Linn. In Streptozotocin induced diabetes. *Indian J Clin Biochem*, **17** : 33-43.

Estepa V., Rodenas S., Martín MC. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal Real Acad Farm*, **67**: 1-16.

Feldman EC, Nelson RW. (2004). Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3ª ed, Editorial Saunders, St. Louis.

Figuerola D. (1997). Diabetes. 3ª Edición. Editorial Masson S.A. Barcelona. 22-25,

Gomez-Dumm CL, Console GM, Luna GC, Dardenne M, Goya RG. (1995). Quantitative immunohistochemical changes in the endocrine pancreas of nonobese diabetic (NOD) mice. *Pancreas*, **11**:396-401.

Goodman, Gilman (1997). *Le basi farmacologiche della terapia*. Mcgraw Hill, Milano.

Guyton AC., Hall JE. (2002). *Tratado de fisiología medica. Décima Edición*. Editorial MacGraw-Hill Interamericana, México. 1063- 1079.

Henry RJ. (1964). *Clinical Chemistry. Principles and techniques*. Editorial Harper and Row publisher. New York.

Henry J. (1979). *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Sixteenth edition. Editorial Saunders company.

Henry RR., (2001). Preventing Cardiovascular Complicationes of Type 2 Diabetes: Focus on lipid Management. *Clin Diabetes*, **19**: 113-120.

Ho Yoon K., Ko S., Cho J., Min Lee J., Bae Ahn Y., Ho Song K., Yoo S., Il Kang M., Cha B., Lee K., Young S., Kang S., Seung Kim H., Lee I., Bonner S. (2003). Selective β Cell Loss and α Cell Expansion in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**:2300–2308.

Inman WD., Luo J., Jolad SD., King SR., Cooper R. (1999). Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. *J Nat Prod*, **62**: 1088-1092.

Kebapçı N., Efe B., Akyüz F., Sunal E., Demirüstü C. (1999). Oxidative stress and Anti-oxidant Therapy in type 2 Diabetes mellitus. *Turkish J Endocrinol Metab*, **4**:153-162.

Klein R. (1995) Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes: *Diabetes Care*, **18**:258-268.

Koyama M., Wada R.I., Sakuraba H., Mizukami H., Yagihashi S. (1998). Accelerated loss of islet β cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Am J Pathol*, **153**: 535-545.

Kuntz E., Pinget M., Damgé C. (2004). Cholecystokinin Octapeptide: A potential growth factor for pancreatic Beta cells in Diabetic Rats. *J Pancreas*, **5**: 464-475.

Kusisto J. (1994). NIDDM and its metabolic control are important predictors of coronary hearth disease in elderly subjects. *Diabetes*, **43**: 960-967.

Latha M., Pari L. (2004). Efect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzumes in experimental rats diabetes. *Braz J Med Biol Res*, **37**: 577-586.

Lawrence, Kaplan, Pesce A. (1996). *Clinical Chemistry, Theory, analysis, Correlation*. 3th edicion. Editorial Mosby. New York.

Lebovitz HE. (1995). A new therapy for diabetes management: alpha- glucosidase inhibition with acarbose. *Clin Diabetes*, **1**: 99-103.

Leif CG., Pelkonen R., Koskimies S., Bottazo GF., Doniac D. (1986). Secondary failure to OHA in NIDDM. *Diabetes Care*, **9**:343-347.

Leif CG., Schalin C., Franssila - Kallunki A., Widen E., Eustraud A., Erikson J. (1989). Characteristics of NIDDM patient with secondary failure to oral antidiabetic drugs. *Am J Med*, **87**: 183-6.

Lopez I. (2004). Estudio patológico de Diabetes tipo I, en caninos por inducción con Alozano[®]. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Patología Animal. Universidad Austral de Chile.

Luna, Lee G. (1968). Manual of Histological Staining Methods of the Armed forces Institute of pathology. 3° edición. McGraw-HillBook Co. New York. P 258-260.

Mahdi A., Chandra A., Singh R., Shukla S., Mishra L.C., Ahmad S. (2003). Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetes rats. *Indian J Clin Biochem*, **18**: 8-15.

Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress and Antioxidants: A Rewiew. *J. Biochem Mol Toxicol*, **17**: 24-38.

Martinez R., Ayamante, I.; Núñez, J.; Romo de Vivar, A. (1979) Leptocarpin and 17,18-dihydroleptocarpin, two new heliangolides from *Leptocarpha rivularis*. *Phytochemistry*, **18**: 1527-1528.

Martínez, R.; Kesternich, V.; Gutiérrez, E.; Dölz, H.; Mansilla, H. (1995). Conformational analysis and biological activity of Leptocarpin and Leptocarpin acetate. *Planta Med*, **61**: 188-189.

Martínez, R.; Kesternich, V.; Carrasco, H.; Bustos, C.; Fernandez, S. (1998). Structure, conformational and biological activity studies on rivularin, a new heliangolide isolated from *Leptocarpha rivularis*. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **43**: 7-12.

Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M., Hillaire-Buys D. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, **47**: 224-229.

Mokdad, A.H., Ford, E.S., Bowman, B.A., Nelson, D.E., Engelgau, M.M., Vinicor, F., Marks JS. (2002). Diabetes trends in the U.S.: 1990–1998. *Diabetes Care*, **23**: 1278–1283.

Nagisa Y. Kato K.; Watanabe K.; Murakoshi H.; Odaka H.; Yoshikawa K.; Sugiyama Y. (2003). Changes in glycated haemoglobin levels in diabetic rats measured with an automatic affinity HPLC. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **30**: 752-658.

Nelson, R. (2000). Diabetes mellitus. 1438-1460. En: Ettinger, S., Feldman E. Textbook of veterinary internal medicine. 5th ed. Editorial Saunders.

Nimenibo-Uadia R. (2003). Control of hyperlipidaemia, hypocholesterolemia and hyperketonaemia by aqueous extract of *Discorea dometorum tuber*. *Trop J Pharm Res*, **2**: 183-189.

Olefsky JM. (1992). Insulin resistance and the pathogenesis of non-insulin dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. New Concepts in the pathogenesis of NIDDM. *Adv Exp Med Biol*, **334**: 129-150.

Macfarlane IA. (1989). The milenia before insulin. En: Pickup JC., Williams G. Teexbook the diabetes. Editorial Blackwell Scientific Publications, Oxford. P 3-9.

Pimenta W., Korytkowski M., Mitrakou A. (1995). Pancreatic β -cell dysfunction as the primary genetic lesion in NIDDM. Evidence from studies in normal glucose-tolerant individuals with a first-degree NIDDM relative. *J Am Med Assoc*, **273**: 1855-1861.

Pipeleers D., Hoonerns A., Marichal-Pipeleers M., Van de Castele M., Bouwens L., Ling Z. (2001). Role of pancreatic β cells in the process of β cell death. *Diabetes*, **50**: S52-57.

Pfaffly J.,(2001). Glucose: A little a goes a long way. *Free Rad Biol Med*, **77**:222-233.

Rastogi K.S., Lickley L.I., Jokay M., Efendic S., Vranic M. (1990). Paradoxical Reduction in pancreatic glucagons with normalization of somatostatin and decrease in insulin in normoglycemic Alloxan diabetic dogs: a putative mechanism of glucagons irresponsiveness to hypoglycemia. *Endocrinol*, **126**: 1096-1106.

Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W., Strynadka K., Lakey J., Rajotte R. (1996). Human pancreatic islet β -cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**:3197-3202.

Roche H.M. (2000). The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk*, **7**:317-324.

Rodríguez J.M., Mora S., Acosta E., Pérez J., Fernández R., Hernández M., Amador J. (2002). Utilización de un índice pronóstico de morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular asociada con factores de riesgo aterogénico. *Rev Cub Med Milit*, **31**: 87:93.

Romay C. (1997). Fructosaminas: su evaluación y utilidad clínica. *Rev Cub Endocrinol*, **8**: 165-170.

Rooman I., Lardon J., Bouwens L. (2002). Gastrin stimulates beta cell neogenesis and increases islets mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes*, **51**: 686-690.

Srinivansan A., Menon V., Periaswamy V., Rajasekaran K.N. (2003). Protection of pancreatic β cell by the potential antioxidant bis-o-hydroxycinnamoyl methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. *J Pharm Pharmaceutic Sci*, **6**: 327-333.

Subramaniam C., Radhakrishnamurthy B., Berenson G. (1980). Photometric Determination of Glycosylation of Hemoglobin in Diabetes Mellitus. *Clin Chem*, **26**: 1683-1687.

Stumvoll S., Mitrakou A., Pimenta W., Jenssen T., Yki-Jarvinen H., Van Haeften T., Renn W., Gerich J. (2000). Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care*, **23**: 295-301.

Taconic[®] (2005). Quality laboratory animal and services for research. University of Cambridge. <http://www.taconic.com/healthr/hematology/sdhome.htm>

Toumilehto J, Lindström J, Eriksson JG., (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*, **344**:1343-1350.

UKPDS. Group:U.K. (1995). Prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes*, **44**: 1249-1258.

Weissberg PL. (2000). Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Indian Heart J*, **52**: 467-472.

Yki-Jarvinen H. (1994). Pathogenesis of NIDDM. *Lancet* , **343**: 91-95.

Zilva J., Pannall P., Mayne P. (1988) *Clinical chemistry in Diagnosis and treatment*. Fifth edition. Editorial Edward Arnold, London, Melbourne y Auckland.