

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE FARMACOLOGÍA**

**EFEECTO HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO FLUIDO DE *Bauhinia candicans*  
EN RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS CON ESTREPTOZOTOCINA**

Memoria de Título presentada como parte  
de los requisitos para optar al **TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO.**

**ANIA MACARENA PÉREZ FUENTES**  
**VALDIVIA-CHILE**  
**2004**

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dra. Viviana Bustos \_\_\_\_\_

**PROFESOR COPATROCINANTE:** Dra. Carolina Gallardo \_\_\_\_\_

**PROFESOR COLABORADOR:** Dr. Leopoldo Ardiles \_\_\_\_\_

**PROFESORES CALIFICADORES:**  
Dr. Juan Hancke \_\_\_\_\_

Dr. Rubén Pulido \_\_\_\_\_

**FECHA DE APROBACIÓN:** 14 de Octubre de 2004.

## ÍNDICE

|                           | Pág. |
|---------------------------|------|
| <b>RESUMEN</b>            | 1    |
| <b>SUMMARY</b>            | 2    |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>       | 3    |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> | 11   |
| <b>RESULTADOS</b>         | 16   |
| <b>DISCUSIÓN</b>          | 29   |
| <b>CONCLUSIONES</b>       | 38   |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>       | 39   |
| <b>ANEXOS</b>             | 47   |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>    | 50   |

## EFFECTO HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO FLUIDO DE *Bauhinia candicans* EN RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS CON ESTREPTOZOTOCINA

### 1. RESUMEN

Con el objeto de aportar en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para la diabetes mellitus, se estudió el posible efecto hipoglicemiente del extracto fluido de *Bauhinia candicans* (Pata de vaca) en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ).

Se utilizaron 15 ratas macho cepa Sprague Dawley, con pesos entre 270-325 g, las que se mantuvieron en jaulas metabólicas durante 20 días, en condiciones estandarizadas de luz, temperatura y humedad. Las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos de cinco individuos cada uno: control sano (1), diabético sin tratamiento (2), diabético con tratamiento (3). Para la inducción de diabetes se administró 45 mg/Kg IV de STZ, disuelta en buffer citrato pH=4 al 0,05 M. Las ratas del grupo control sano se inyectaron vía IV sólo con buffer citrato. Transcurridas 48 hrs. post-administración de STZ se determinó glucosuria. Las ratas positivas fueron evaluadas 24 hrs. después para determinar sus valores de glicemia, aquellas con valores por sobre los 300 mg/dL se usaron para conformar los grupos 2 y 3. Una vez confirmada la inducción de diabetes, se administró 0,25 ml/día p.o. de extracto fluido de *Bauhinia candicans* al grupo 3 (250 mg/rata) y 0,25 ml/día p.o. de NaCl al 0,9% a los grupos experimentales 1 y 2, desde el día 4 hasta el día 19 del estudio.

A las 72 hrs. post-administración de STZ, todas las ratas inducidas generaron un alza de la glicemia en un 350% en comparación a sus valores basales. Se demostró alteración en el metabolismo de los lípidos y proteínas en las ratas diabéticas, regulándose significativamente ( $p < 0,05$ ) el colesterol y el metabolismo proteico en el grupo 3 el día 15 del estudio. Los resultados para clearance de creatinina mostraron un aumento significativo al comparar el grupo 1 con los grupos 2 y 3, como ha sido descrito en ratas inducidas con STZ previo a un desarrollo de nefropatía clínica. Los días 5 y 20 se observaron cambios significativos en las proteínas urinarias y el clearance de creatinina de las ratas del grupo 3 con respecto al grupo 2, sugiriendo un efecto protector renal por parte del extracto. En cuanto a los signos cardinales de la diabetes, hacia el término del estudio (días 15 y 20) se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo 2 y el grupo 3 para excreción de orina y consumo de alimento, y una tendencia a la baja en el consumo de agua.

Los valores de glicemia del grupo tratado mostraron una tendencia a la disminución no estadísticamente significativa (desde el día 10 al día 20 del estudio), por lo que la hipótesis planteada fue rechazada. En ratas tratadas con el extracto fluido de *Bauhinia candicans* se logra el control en la expresión de signos como excreción de orina y consumo de alimento, por lo que nuevas investigaciones con modificaciones en el protocolo experimental serían un aporte para nuevas opciones terapéuticas en esta materia.

**Palabras clave:** Diabetes, *Bauhinia candicans*, estreptozotocina, hipoglicemiente.

## HYPOGLYCEMIC EFFECT OF *Bauhinia candicans* EXTRACT IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

### 2. SUMMARY

To the aim of contribute the search of therapeutical new options to diabetes mellitus, the possible hypoglycemic effect of *Bauhinia candicans* extract (Cow foot) was investigated in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

A total of 15 male Sprague-Dawley rats, weighing 270-325 g, were housed singly in metabolic cages and maintained under controlled environmental conditions of temperature, humidity and a 12 h light/dark cycle for 20 days. Rats were randomly divided into three groups (n=5): Non-diabetic control (1), Diabetic control (2), Diabetic-treated group (3). Diabetes was induced by a single tail vein injection of STZ (45 mg/Kg body weight) diluted in citrate buffer (0,05 M, pH 4), i.v. Group 1 received only the citrate buffer. 48 h after, rats showing positive glucosuria were separated to confirm the diabetes. Rats showing blood glucose levels above 300 mg/dL were incorporated in group 2 and 3. When diabetes was confirmed, animals of group 3 received 0,25 ml/day p.o *Bauhinia candicans* extract (250 mg/rat), and animals of the group 1 and 2 received 0,9 %NaCl (0,25 ml/day p.o) from day 4 until day 19.

72 h STZ post-administration, all diabetic rats increased serum levels of glucose over 350% of basal glycaemia. Modifications of the lipid and protein metabolism in diabetic rats was demonstrated, but in group 3 cholesterol and protein metabolism was regulated in day 15. Creatinine clearance was significantly higher ( $p < 0,05$ ) in diabetic groups (2 and 3). This increase has been reported in STZ-induced diabetic rats prior to development of clinical nephropathy. Proteinuria changes significantly were observed in days 5 and 20 and also at creatinine clearance of the group 3 rats compared to the group 2 rats. This condition suggests a protective effect of the extract. Related with the diabetes typical signs, results showed statistically significant differences in day 15 and 20 between group 2 and group 3 in urinary volume and food intake, and a non statistically significant decrease tendency in water intake.

A non significantly decrease was observed between 10 and 20 day in glucose serum levels of the treated group (3), so the hypothesis was rejected. *Bauhinia candicans* extract treatment produce a control of the manifestation of signs like urinary volume and food intake, therefore other investigations with some modifications in the experimental protocol will be a contribution to new therapeutical options in diabetes.

**Key words:** Diabetes, *Bauhinia candicans*, streptozotocin, hypoglycemic.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus ha llegado a afectar a más de 100 millones de personas, siendo probablemente en la actualidad, la enfermedad metabólica más importante del mundo (Arun y Nalini, 2002).

Esta enfermedad se define como un conjunto de síndromes que se caracterizan por un déficit en la secreción de insulina o de su acción, lo que origina trastornos en el metabolismo intermediario de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, y que se caracteriza por múltiples manifestaciones clínicas y anatómicas (Contreras, 1994; Pizzorno y Murray, 1995; Figuerola, 1997; Herrera, 2001).

##### 3.1.1. Clasificación de la Diabetes Mellitus

3.1.1.1. Diabetes mellitus insulino dependiente (DMID): Baynes y Dominiczak (1999) y Herrera (2001), señalan que del número total de diabéticos en el mundo, aproximadamente el 10% corresponde a DMID, antiguamente denominada diabetes tipo I. Existe una llamativa variación geográfica, presentando la mayor incidencia Finlandia con 35,2/100.000 personas/año (Herrera, 2001). Este tipo de diabetes se caracteriza básicamente por un inicio en general brusco y antes de los 30 años, tendencia a la cetosis, ausencia de obesidad y evidencia de fenómenos autoinmunitarios en su etiología (Figuerola, 1997), es así que en el momento del diagnóstico se aprecia la virtual desaparición de las células  $\beta$  del páncreas encargadas de producir la insulina, ya sea por un proceso autoinmunitario o idiopático (Freijanes y Flórez, 1997). Este proceso comienza por una susceptibilidad genética y algunos acontecimientos ambientales inician el proceso destructivo de estas células pancreáticas (Foster, 1998).

3.1.1.2. Diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID): La DMNID -diabetes tipo II- corresponde aproximadamente al 90% del número total de diabéticos en el mundo (Baynes y Dominiczak, 1999; Herrera, 2001), y se caracteriza porque suele iniciarse de forma progresiva después de los 40 años, no tiende a la cetosis, frecuentemente cursa con obesidad y presenta una pronunciada agregación familiar (Figuerola, 1997). En este grupo de síndromes, el páncreas secreta cantidades muy variables de insulina, de forma que su concentración plasmática puede ser normal o incluso superior a la normal, pero relativamente insuficiente para mantener niveles normales de glicemia (Freijanes y Flórez, 1997). La alta frecuencia de la DMNID, y su aumento, se debe -entre otros factores- al incremento de la vida media de la población en general y al estilo de vida de ésta (obesidad, dieta rica en grasas y sedentarismo) (Figuerola, 1997; Freijanes y Flórez, 1997; Herrera, 2001).

3.1.1.3. Diabetes mellitus secundaria (tipo III): Ésta se presenta producto de enfermedades o tratamientos medicamentosos. Algunos ejemplos son las producidas por defectos genéticos en la función de la célula y en la acción de insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, infecciones, drogas o agentes químicos como el ácido nicotínico (Maiz, 1992; Raddatz y col., 1998).

### **3.1.2. Fisiopatología de la Diabetes Mellitus**

La insulina es una proteína constituida por dos cadenas de aminoácidos (A y B), las que están unidas por dos puentes disulfuro (Figuerola, 1997; Greco y Stabenfeldt, 1999). Se sintetiza en el interior de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas en forma de un precursor, la “proinsulina”, el cual en el momento de su liberación a la sangre, se rompe en sus dos componentes, “insulina” y “péptido C” (Arteaga, 1992; Figuerola, 1997); esta liberación en el páncreas está sometida a múltiples factores de regulación: químicos, nerviosos y hormonales, pero como es lógico, son las modificaciones de los principales sustratos energéticos (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos) los que inducen modificaciones inmediatas en la respuesta (Freijanes y Flórez, 1997). Los efectos de la insulina corresponden principalmente a la disminución de las concentraciones sanguíneas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, promoviendo la conversión intracelular de éstos en sus formas de almacenamiento en el organismo, como lo son glucógeno, triglicéridos y proteínas (Greco y Stabenfeldt, 1999).

Cuando ocurre un déficit secretor de insulina (insulinopenia), una disminución de la sensibilidad periférica a la insulina (insulinorresistencia) o una combinación de ambos mecanismos se llega a la hiperglicemia (Figuerola, 1997). Ésta es la causante de los síntomas clásicos de la diabetes: polidipsia, polifagia y poliuria (Foster, 1998; Velásquez, 2001). Otro síntoma considerado como clásico es la astenia, se caracteriza por un malestar general producido por el defecto metabólico generalizado a causa de la falta o ineficaz acción de la insulina, la principal hormona anabólica (Jara y col., 2001). El adelgazamiento, signo clásico de la DMID, es producido por la ineficacia del metabolismo glucídico, proteico y graso, debido a la falta o disminución importante de insulina. En lo que respecta a la DMNID, como aún existe una reserva importante de insulina (o incluso niveles altos), suele haber tendencia a la obesidad, que acentúa aún más el proceso de resistencia insulínica característico de la DMNID. La tendencia a las infecciones no suele incluirse entre los signos clásicos, pero es frecuente, al igual que el retraso de la cicatrización de las heridas en estados avanzados de la diabetes, en especial en los pies (Jara y col., 2001).

### **3.1.3. Complicaciones agudas y crónicas de la Diabetes Mellitus**

Las complicaciones de la diabetes mellitus se clasifican en agudas y crónicas (Figuerola, 1997; Velásquez, 2001). Además de la hipoglicemia, los diabéticos están expuestos a dos complicaciones metabólicas agudas importantes: la cetoacidosis diabética y el coma hiperosmolar no cetósico (Foster, 1998). En cuanto a las complicaciones crónicas, se pueden mencionar alteraciones neurológicas y de los vasos pequeños (microangiopatía), tanto de la retina (retinopatía) como de los glomérulos renales (nefropatía) (Figuerola, 1997;

Velásquez, 2001). Este compromiso microvascular es causa de ceguera y de insuficiencia renal crónica, respectivamente, la microalbuminuria definida como la excreción urinaria de 30 a 300 mg/día de albúmina, es una condición que antecede al desarrollo de nefropatía irreversible, caracterizada por la existencia de una excreción urinaria de albúmina mayor a 300 mg/24 horas, conocida como macroalbuminuria, la que suele aparecer en evoluciones de la enfermedad superiores a 10-15 años (Foster, 1998; Esmatjes, 2001; Velásquez, 2001).

El mal control de la diabetes conduce también a la macroangiopatía, definida por Lobón y Escobar (2001) como una afección global de los grandes vasos. La macroangiopatía puede afectar las arterias coronarias, cerebrales y periféricas, incrementando las complicaciones cardiovasculares en estos pacientes (GedapS, 2000; Velásquez, 2001).

La enfermedad isquémica miocárdica es bastante frecuente en los países industrializados, se desarrolla a consecuencia del proceso obstructivo coronario, contribuyendo sustancialmente a la morbilidad y mortalidad por enfermedad de los grandes vasos, es así que de las muertes asociadas a la diabetes, al menos el 50% son debidas a enfermedad coronaria (Lobón y Escobar, 2001).

#### **3.1.4. Diagnóstico**

En la actualidad se sabe que el diagnóstico precoz de la diabetes mellitus es de gran utilidad para la prevención de las complicaciones de esta enfermedad (Sánchez, 2001). Habitualmente en clínica no hay dificultad para el diagnóstico de la diabetes. La presencia de los síntomas clásicos de la enfermedad, junto a una estimación de la glicemia que exceda valores referenciales confirman su existencia, así como también cuando los síntomas son triviales o no existen. Es por esto que, en sentido estricto, el diagnóstico de la diabetes es exclusivamente bioquímico (Durruty, 1992; Figuerola, 1997).

Los rangos de glicemia establecidos como normales en el humano son menor de 110 mg/dL en ayunas y menor de 140 mg/dL a las 2 horas post-test de tolerancia oral a la glucosa (Raddatz y col., 1998; Sánchez, 2001). En el caso de las ratas, los rangos normales de glicemia varían de 47,7 a 107 mg/dL (Kaneko, 1997; Zanoello y col., 2002).

Según Raddatz y col. (1998) y Sánchez (2001), el Comité de Expertos para el Diagnóstico y la Clasificación de la Diabetes Mellitus de la Asociación Americana de Diabetes, plantea tres formas posibles de diagnosticar la diabetes:

- Síndrome diabético agudo (polidipsia, poliuria y baja de peso) y una glicemia mayor o igual a 200 mg/dL realizada a cualquier hora del día.
- Glicemia de ayuno mayor o igual a 126 mg/dL (ayuno definido como 8 horas sin ingesta calórica).
- Glicemia a las 2 horas después de una prueba de tolerancia oral a la glucosa mayor o igual a 200 mg/dL.



Para efectos diagnósticos, no se precisan otras pruebas ni técnicas de laboratorio para identificar a los pacientes con diabetes mellitus, pero los análisis básicos para el control de ésta son, además de la glicemia, la glucosuria, cetonemia, y cetonuria. Además, es necesario estudiar periódicamente las proteínas en orina; en los casos en que la proteinuria sea negativa, resulta conveniente realizar mediciones de microalbuminuria. También se debe comprobar el estado de la función renal con los clearance de creatinina. Por la significativa asociación que existe entre dislipidemia y diabetes, es necesario determinar a lo menos una vez al año los niveles de los lípidos sanguíneos, es decir, colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL. Es muy útil si es posible, disponer del perfil lipoproteico de los pacientes (Durruty, 1992). La medición de la concentración de solutos en la orina, principalmente urea, cationes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y aniones como  $\text{Cl}^-$  son considerados buenos indicadores del grado existente de glucosuria, y por lo tanto de diabetes (Kaneko, 1997).

### 3.1.5. Tratamiento

Actualmente existen diversas maneras de tratar el problema de la diabetes, pero hay que tener en consideración cuál es el tipo de diabetes que se quiere tratar. Una manera de hacerlo es con el uso de insulina sintética, otra es por medio de los hipoglicemiantes orales y por último están las plantas medicinales (Pizzorno y Murray, 1995). Cualquiera sea el tratamiento, es indispensable enfatizar el rol central que cumple la dieta, pilar fundamental, sin la cual es imposible obtener un control aceptable de la enfermedad (Maiz, 1992).

La importancia de la dieta en el manejo de la diabetes mellitus ha sido reconocida y practicada durante siglos, en distintas partes del mundo, pero la ampliación de los objetivos y nuevos conocimientos han introducido cambios en las recomendaciones, que en algunos casos son contradictorias, ya que la prescripción debe ser individual y flexible, tomando en cuenta los principales riesgos patológicos del enfermo y sus condiciones socioeconómicas (Arteaga, 1992; Manzano y col., 2001). Junto con el régimen dietético, el ejercicio físico constituye uno de los pilares básicos en el tratamiento de la diabetes mellitus, siendo eficaz para prevenir la aparición de la DMNID (Marañés y col., 2001).

3.1.5.1. Insulina sintética: Se disponen de cuatro tipos principales de insulinas: 1) de acción ultra breve, con muy rápido comienzo de acción y corta duración, 2) de acción breve, con rápido comienzo de acción, 3) de acción intermedia, y 4) de acción prolongada, con comienzo lento de acción (Freijanes y Flores, 1997). La insulina sintética, usada para el tratamiento de la DMID, presenta reacciones adversas de las cuales la hipoglicemia es la principal y la más frecuente (Karam, 1999). También pueden ocurrir alergias, en la cual la urticaria local o sistémica se debe a la liberación de histamina por los mastocitos tisulares, sensibilizados por los anticuerpos IgE antiinsulina; en casos graves puede presentarse anafilaxis (Karam, 1999). Es frecuente que al comienzo aparezca el edema insulínico, cuya causa no se ha establecido, siendo pasajero y careciendo de significación clínica. También pueden aparecer reacciones lipodistróficas en forma de atrofia o hipertrofia en el tejido celular subcutáneo de los sitios de inyección, pero ya no son tan corrientes con las modernas insulinas (Freijanes y Flórez, 1997).

3.1.5.2. Hipoglicemiantes orales: Los hipoglicemiantes orales desempeñan un papel primordial en el tratamiento de la DMNID (De la Calle, 2001). Se incluyen en este tipo de fármaco a las biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, y al grupo que se destaca, la familia de las sulfonilureas (Freijanes y Flórez, 1997). Estos fármacos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus tienen diferente mecanismo de acción y por lo tanto distintos tejidos blanco.

Las biguanidas disminuyen las concentraciones de glucosa al aminorar la producción hepática de ésta (reduciendo la gluconeogénesis) y aumentar la acción de la insulina en el músculo y la grasa. Las biguanidas también pueden disminuir la glucosa plasmática al reducir la absorción de la glucosa desde el intestino, pero no se ha demostrado que este efecto tenga importancia clínica. Las reacciones adversas más frecuentes son las gastrointestinales: anorexia, náuseas, molestias abdominales y diarrea; la reacción más grave, aunque rara, es la acidosis láctica, que puede llegar a ser letal pero sólo aparece si se dan dosis tóxicas o dosis normales en pacientes con insuficiencia renal o cardíaca, enfermedad hepática, alcoholismo o en mujeres embarazadas (Freijanes y Flórez, 1997; Davis y Granner, 2003).

La acción de las tiazolidinedionas exige la presencia de insulina. Éstas ejercen sus principales efectos al disminuir la resistencia a la insulina en tejidos periféricos, pero también se ha informado un efecto que disminuye la producción de glucosa en el hígado. Las tiazolidinedionas aumentan el transporte de glucosa hacia el tejido muscular y adiposo al incrementar la síntesis de formas específicas de las proteínas transportadoras de glucosa, y la translocación de las mismas (Davis y Granner, 2003). Las tiazolidinedionas pueden producir molestias gastrointestinales de diverso carácter, en asociación con otros hipoglicemiantes puede ocasionar hipoglicemia y en ocasiones ha reducido ligeramente los niveles de hemoglobina y se han descrito algunos casos de intolerancia hepática (Freijanes y Flórez, 1997; Davis y Granner, 2003).

Para que los carbohidratos de la dieta se absorban, deben ser hidrolizados en monohidratos en el tubo intestinal. Los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos son transformados en monosacáridos mediante la hidrólisis producida por las  $\alpha$ -glucosidasas glucoamilasa, sacarasa, maltasa e isomaltasa, que se encuentran en la superficie luminal de las microvellosidades intestinales (Freijanes y Flórez, 1997). Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas reducen la formación de monosacáridos y, consiguientemente, la disponibilidad de la glucosa y otras hexosas para ser absorbidas en el intestino (Davis y Granner, 2003). Las reacciones adversas más frecuentes son de carácter gastrointestinal en forma de distensión abdominal, diarrea y borborigmos, provocadas por la fermentación de los carbohidratos no absorbidos. Estos síntomas suelen mejorar al avanzar el tratamiento, por lo que se recomienda empezar con dosis bajas y reducir la ingesta de disacáridos (Freijanes y Flórez, 1997; Davis y Granner, 2003).

Las sulfonilureas estimulan la secreción endógena de insulina, aunque no su síntesis, es por esto que necesariamente requieren de las células  $\beta$  funcionando. Además de este efecto, inhiben la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática, y pareciera que pueden mejorar la

utilización de la insulina en los tejidos a través de su efecto sobre el receptor a esta hormona (Figuerola, 1997). Como ejemplos de este grupo se puede señalar a tolbutamida, clorpropamida, tolazamida y glibenclamida (Karam, 1999, De la Calle, 2001).

Hay evidencias que indican que estas drogas actualmente producen una amplia gama de efectos secundarios. El principal corresponde a la hipoglicemia que en muchos casos llega a ser severa y prolongada, siendo mayor el riesgo con las sulfonilureas de acción prolongada (clorpropamida), o en casos de ancianidad y consumo habitual de alcohol. Otros efectos secundarios menos frecuentes suelen aparecer en los primeros meses de tratamiento, como por ejemplo las reacciones cutáneas, alteraciones hematológicas, hepáticas y gastrointestinales (Pizzorno y Murray, 1995; Figuerola, 1997; GedapS, 2000). Las sulfonilureas están contraindicadas en aquellos pacientes que padecen diabetes secundaria a una pancreopatía, en el embarazo y la lactancia, en presencia de cetosis, en procesos intercurrentes graves (como infarto agudo de miocardio), en cirugía mayor y en caso de alergias a los derivados sulfamídicos (Figuerola, 1997; GedapS, 2000).

Figuerola (1997), afirma que ninguna de las actuales posibilidades de tratamiento para la diabetes es completamente satisfactoria, por lo que se precisan nuevas opciones terapéuticas para mejorar el control metabólico y prevenir las manifestaciones crónicas de la enfermedad. Es esto lo que induce al enfermo diabético a buscar, a través de la medicina popular o tradicional, el uso de preparados vegetales para el tratamiento de su patología (Nachar, 1994).

3.1.5.3. Plantas medicinales: Un cierto número de plantas tradicionalmente usadas como antidiabéticas, han mostrado actividad hipoglicemiantes en animales de laboratorio o en el hombre, aunque no se han identificado en todas el o los compuestos responsables. India y Brasil se destacan en esta materia, comprobándose gracias a sus innumerables investigaciones en fitoterapia el efecto hipoglicemiantes de variadas especies vegetales: *Syzygium jambolanum*, *Allium cepa*, *Cajanus cajan*, *Gymnema silvestre*, *Agaricus bisporus*, por nombrar sólo algunas (Soares y col., 2000; Grover y col., 2002).

En Chile, existe una variedad muy amplia de plantas utilizadas en medicina popular para el tratamiento de la diabetes, algunos ejemplos son: Nogal, Culén, Zarzamora, Linaza, Galega, Salvia, Morena negra y Pata de vaca (Hoffmann y col., 1992; Nachar, 1994; Velásquez, 2001).

La Pata de vaca, cuyo nombre científico es *Bauhinia candicans*, corresponde a un árbol de la familia de las Leguminosas. Es originario de Asia, donde se le encuentra desde la India hasta Malasia y China; también se encuentra en Argentina y en nuestro país, principalmente en la ciudad de Concepción. Este árbol mide de 4 a 6 mts. de altura, con ramificaciones extendidas y zigzagueantes, y copa irregular y globosa. La corteza es marrón-grisácea, fisurada, y tiene la particularidad de presentar hojas -a las cuales se le atribuyen sus propiedades medicinales- simples y bífidas, alternas sobre las ramas, provistas de un pecíolo alargado que tiene en su base dos estípulas espinosas (Hoffmann, 1998; Muñoz y col., 2001; Luize y Cechinel, 2002) (Anexo 1). Hoffmann y col. (1992) indica que esta planta, además de ser usada como antidiabética, es utilizada en Chile como anticatarral, diurética, para

afecciones estomacales, úlceras y lavado de toda clase de heridas, además de anticásps. Ésta comúnmente es administrada en infusiones (Hoffmann y col., 1992), aunque también existen laboratorios que ofrecen su extracto fluido.

Nuestro país no ha estado ajeno a las investigaciones realizadas en fitoterapia, es así como en la Universidad de Chile se ha evaluado en distintos estudios a través de los años, la actividad hipoglicemiante de algunas plantas utilizadas en medicina popular, obteniéndose en una misma planta resultados contradictorios, dependiendo del protocolo experimental utilizado (Nachar, 1994).

### 3.1.6. Diabetes experimental

Los modelos experimentales que actualmente están siendo utilizados en las investigaciones de diabetes en todo el mundo son el uso de químicos y los animales transgénicos, existiendo para estos últimos una gran variedad de cepas, las que difieren según sea el fin de la investigación (\*). Para el caso de las ratas, la cepa BB es ampliamente usada como modelo de DMID (Kaneko, 1997) y las cepas Wistar Fatty Rats y las Zucker Fatty Rats como modelo de DMNID, entre muchas otras (Noda y col., 2001).

La inducción de diabetes experimental en animales de laboratorio usando químicos, los cuales destruyen la célula  $\beta$  pancreática, es muy conveniente y de uso bastante simple. Para este fin, los químicos más utilizados en la actualidad son aloxano y estreptozotocina (STZ) (Szkudelski, 2001).

La STZ es una nitrosourea sintetizada por el microorganismo *Streptomyces achromogenes*, se le han atribuido propiedades antineoplásicas y antibióticas, y es comúnmente utilizado en la inducción de diabetes mellitus debido a su efecto tóxico específico de la célula  $\beta$  pancreática (Konrad y col., 2001; Szkudelski, 2001; Bolzan y Bianchi, 2002). El rango de dosis utilizada es bastante amplio. En el caso de las ratas, lo más frecuente es que se utilice una dosis endovenosa (IV) única de 40 a 60 mg/Kg de peso. Este rango también es eficaz cuando se aplica una sola vez intraperitonealmente, pero dosis menores a 40 mg/Kg pueden ser insuficientes para la inducción de diabetes (Szkudelski, 2001).

Zhang y col. (2003), asegura que previo a una alimentación hipercalórica durante 2 meses, la administración IV de STZ en dosis única de 15 mg/Kg bastaría para inducir DMNID en ratas. Thibault y col. (1992), analizó el poder diabetogénico de STZ en dosis de 20, 27, 30 y 35 mg/kg IV, obteniendo grados de intolerancia a la glucosa que aumentaban a medida que se incrementaba la dosis.

La STZ entra a la célula  $\beta$  vía transportador de glucosa GLUT2 y causa alcalinización del ADN. El daño a este ADN induce la activación de poli ADP-ribosilación, un proceso que es más importante en la actividad diabetogénica de la STZ que el daño mismo al ADN. La poli ADP-ribosilación produce una disminución del NAD<sup>+</sup> y ATP. Aumentada la desfosforilación del ATP, después de un tratamiento con STZ, se provee de un sustrato para la xantina oxidasa,

(\*): JAX Mice & Services, <http://www.jax.org/jaxmice>

resultando en la formación de radicales superóxidos. Consecuentemente, también son producidos peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. Además, la STZ libera cierta cantidad tóxica de óxido nítrico, el que inhibe la actividad celular y también participa en el daño al ADN. Como resultado de la acción de STZ, se produce la destrucción de la célula  $\beta$  pancreática por necrosis y el consecuente estado diabetogénico (Szkudelski, 2001).

La acción de STZ en la célula  $\beta$  produce hiperglicemia y una disminución de los niveles de insulina circulantes a las 2 horas después de administrada, sin embargo, 6 horas post-administración, se presenta hipoglicemia e hiperinsulinemia. Finalmente, los niveles de insulina disminuyen y se produce hiperglicemia (West y col., 1996).

### **3.2. OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO**

Evaluar el efecto hipoglicemiante del extracto fluido de *Bauhinia candicans* en ratas diabéticas inducidas con STZ, a través de la medición de cambios metabólicos indicadores de diabetes en ratas por medio de la determinación de variables sanguíneas, urinarias y nutricionales.

### **3.3. HIPÓTESIS**

El extracto fluido de *Bauhinia candicans*, tiene un efecto hipoglicemiante en ratas diabéticas inducidas con STZ.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Material biológico

Se utilizaron 15 ratas macho cepa Sprague Dawley, con pesos entre 270-325 g, procedentes del bioterio del Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Las ratas se mantuvieron en jaulas metabólicas durante 20 días, en condiciones estandarizadas de luz, temperatura y humedad.

#### 4.1.2. Material farmacológico

- Estreptozotocina (Laboratorio Sigma).
- Buffer citrato 0,05 M, pH 4.
- Extracto fluido de *Bauhinia candicans* (Laboratorio Knop).
- Éter (Laboratorio Equilab).
- Heparina Sódica (Laboratorio Sanderson).

#### 4.1.3. Otros materiales

- Jaulas metabólicas.
- Balanza.
- Tiras reactivas Human Test Combina 10 M (Laboratorio Human).
- Material de laboratorio.

### 4.2. MÉTODOS

#### 4.2.1. Grupos Experimentales

Las ratas se dividieron en tres grupos de cinco individuos cada uno (n=5):

- Grupo Control (1).
- Grupo Diabético sin tratamiento (2).
- Grupo Diabético con tratamiento (3).

Con el fin de establecer los valores basales de todos los animales en estudio, previo a la inducción de diabetes, se sometieron a un control de valores sanguíneos y urinarios, para determinar si se encontraban dentro de los rangos de referencia para la especie.

Considerando además que la diabetes es una enfermedad metabólica que presenta signos clínicos cardinales: poliuria, polidipsia, polifagia, y adelgazamiento, se registró la excreción de orina (ml), consumo de agua (ml) y concentrado (g), y peso vivo (g).

#### 4.2.2. Inducción de diabetes

Las ratas de los grupos 2 y 3, se inyectaron vía IV (vena coccígea) con 45 mg/Kg de STZ, disuelta en buffer citrato pH= 4 al 0,05 M (1 ml/Kg de peso vivo) (adaptado del protocolo de Degenhardt y col., 2002 y Shenoy y Goyal, 2002). Las ratas del grupo 1 se inyectaron vía IV (vena coccígea) sólo con buffer citrato (1 ml/Kg de peso vivo).

Transcurridas 48 horas post-administración de STZ se determinó glucosuria a través de tiras reactivas, como criterio de inclusión se usó la glucosuria positiva para separarlos y evaluar 24 horas después sus glicemias. Las ratas con valores sanguíneos de glucosa sobre 300 mg/dl se usaron para conformar los grupos 2 y 3. La muestra de sangre se obtuvo del plexo venoso retro-orbital usando tubos de microhematocrito heparinizados.

#### 4.2.3. Tratamiento

Una vez inducida la diabetes, los grupos recibieron 0,25 ml por día p.o., vía sonda bucoesofágica de:

- Grupo 1 (Control): NaCl al 0,9%.
- Grupo 2 (Diabéticas sin tratamiento): NaCl al 0,9%.
- Grupo 3 (Diabéticas tratadas): extracto fluido de *Bauhinia candicans*, en dosis total de 250 mg/rata (Anexo 2).

#### 4.2.4. Valoración de variables metabólicas

4.2.4.1. Determinaciones sanguíneas: las muestras (1,5 ml de sangre/rata) se extrajeron en ayuna del plexo venoso retro-orbital utilizando tubos de microhematocrito heparinizados y hependorf, los días 5, 10, 15 y 20 del ensayo, y se procesaron por medio del analizador semi-automático Microlab 200 (Laboratorio Merck).

4.2.4.1.1. Glicemia: La glucosa-oxidasa es uno de los métodos que más se emplea en la actualidad para determinar glicemia, sea para fines diagnósticos o de control, y constituye el principio básico de las tiras reactivas para glicemia en sangre capilar (Kaneko, 1997). También se realiza este método en los sistemas automatizados con espectrofotómetro o fotocolorímetro (Durruty, 1992). Bajo la acción de la enzima glucosa-oxidasa (GOD), la glucosa se oxida a gluconolactona en presencia de oxígeno atmosférico. El peróxido de hidrógeno formado oxida al indicador en presencia de peroxidasa (POD), la intensidad de color del tinte rojo resultante es directamente proporcional a la concentración de glucosa y puede ser medido fotométricamente (Durruty, 1992; Howanitz y col., 1993).

4.2.4.1.2. Triglicéridos: Para el análisis sanguíneo de los triglicéridos se prefieren los métodos enzimáticos (Kaneko, 1997). El método utilizado en este estudio fue el enzimático-colorimétrico conocido como GPO-PAP (glicerol fosfatasa oxidasa-peroxidasa). Desde el punto de vista estructural, los triglicéridos son compuestos orgánicos en los que una molécula de glicerol está esterificada con tres moléculas de ácidos grasos (Durruty y García, 1992; Rifai y col., 1999). Con esta técnica se disocia el glicerol de los triglicéridos por acción de una lipasa lipoproteica. El glicerol se oxida formando dihidroxiacetonafosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido forma, bajo la acción catalítica de la peroxidasa con 4-aminofenazona y 4-clorofenol, un colorante rojo (Cole y col., 1997).

4.2.4.1.3. Colesterol: En cuanto a la determinación de colesterol sanguíneo, el método utilizado fue el enzimático colorimétrico conocido con el nombre de CHOD-PAP (colesterol esterasa oxidasa-peroxidasa) (Artiss y Zak, 1997; Kraft y Schillinger, 1999). Bajo la acción catalítica de la enzima colín-esterasa, los ésteres de colesterol se hidrolizan en colesterol y ácidos grasos; el colesterol libre se oxida en presencia de oxígeno a colesteno, formándose al mismo tiempo peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminofenazona y fenol para formar un colorante rojo cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de colesterol y puede ser medido fotométricamente (Durruty, 1992; Artiss y Zak, 1997; Kraft y Schillinger, 1999).

El colesterol total se puede determinar en cualquier momento del día, no se requiere que el individuo esté en ayuno ya que los valores no se modifican significativamente aún con una comida que contenga lípidos. No obstante, es preferible que esté en ayuno para el análisis de otras fracciones lipídicas, como los triglicéridos (Durruty, 1992), ya que en el plasma posprandial suelen existir quilomicrones que, dependiendo del tipo y cantidad de comida ingerida, pueden incrementar considerablemente la concentración de triglicéridos en el plasma, pero muy escasamente la de colesterol. El aclaramiento de quilomicrones se produce en pocas horas, considerándose anormal su presencia tras 12 horas de ayuno (Segal y col., 1991).

4.2.4.1.4. Proteínas totales: Para su determinación total en sangre se utilizó el método colorimétrico “método de Biuret”, el cual se considera como estándar por su alta especificidad (Kraft y Schillinger, 1999). Éste se fundamenta en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con el ion cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra (McPherson, 1993; Kraft y Schillinger, 1999).

4.2.4.1.5. Creatinina: El método utilizado para la determinación de creatinina sérica fue el de Jaffé. Este se fundamenta en que la creatinina, en presencia de picrato alcalino produce un color amarillo-anaranjado (reacción de Jaffé), el cual es medido fotométricamente. La velocidad con que el cromógeno se forma es directamente proporcional a la cantidad de creatinina presente en la muestra (Woo y Cannon, 1993; Kraft y Schillinger, 1999).



4.2.4.2. Determinaciones urinarias: se realizaron los días 5, 10, 15 y 20 del ensayo.

4.2.4.2.1. Glucosa: En cuanto a la estimación semicuantitativa de glucosuria, se utilizaron tiras reactivas (Human Test Combina 10 M) fundamentadas en el método enzimático de la glucosa-oxidasa. Este método puede arrojar falsos negativos en orinas con altos contenidos de ácido ascórbico o pH bajo, y falsos positivos por lavado de los recipientes que contienen la orina con sustancias oxidantes (Kraft y Schillinger, 1999). Este método depende de la subjetividad en la lectura, además los rangos de resultados son amplios, lo que resta sensibilidad al método. Pese a esto, la determinación de glucosuria por medio de la lectura de tiras reactivas es ampliamente utilizada (Kaneko, 1997).

4.2.4.2.2. Proteínas: La determinación de proteínas totales en orina se realizó mediante el método U/CSF Protein (Ensayo cinético) por medio del analizador automático Hitachi 911 de Roche. La muestra se preincubó en una solución alcalina que contenía EDTA, que desnatura las proteínas eliminando las interferencias de los iones de magnesio. Luego, se agregó cloruro de bencetonio, produciendo la turbidez leída (Tietz, 1995).

4.2.4.2.3. Creatinina: Para la determinación de creatinina en orina se empleó el mismo método que para la creatinina sérica, realizándose en orina de 24 horas; no obstante, también se puede hacer en períodos más cortos de tiempo, considerando además, el volumen de orina recolectado (Durruty, 1992).

4.2.4.2.4. Determinación de Clearance: El cálculo para el clearance de creatinina es el siguiente (Verlander, 1999; Jyothirmayi y col., 2001):

$$\text{Clearance} = \frac{\text{Creatinina en orina (mg/dL)} \times \text{vol. Orina 24 hrs. (\mu\text{l})}}{\text{Creatinina en suero (mg/dL)} \times 1440 \text{ (minutos)}}$$

4.2.4.3. Otros indicadores: se determinó el consumo de agua y concentrado, volumen de orina excretado y peso vivo los días 5, 10, 15 y 20 del ensayo.

El día 20, posterior a la toma de muestra, se sacrificaron las ratas de cada serie por sobredosis de anestesia (Éter).

#### 4.2.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este estudio se expresaron en valores promedios y sus errores típicos, efectuándose además pruebas inferenciales intra grupos y entre grupos, paramétricas y no paramétricas. Se trabajó con un nivel de significación de 0,05; considerándose significativo un  $p < 0,05$ .

La metodología estadística aplicada en el análisis de los resultados fue la siguiente:

- Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, la que se usó con el fin de comprobar la normalidad de los datos (Zar, 1999).
- Prueba de homocedasticidad de Barlett, usada para comprobar que las varianzas entre las series sean homogéneas (Zar, 1999).
- Análisis de varianza paramétrico (Andeva) de una vía, cuyo objetivo es comparar los promedios de tres o más grupos de datos (Spiegel, 1991).
- Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, usada en los casos en que el Andeva paramétrico resultó significativo (Zar, 1999).
- Análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, el que se usó en los casos en que no se cumplen los requisitos de normalidad y homocedasticidad (Rosner, 2000).
- Prueba de comparaciones múltiples no paramétricas de Dunn, la que se aplicó en los casos en que la prueba de Kruskal-Wallis resultó significativa (Rosner, 2000).
- Prueba  $t$  de Student de datos no pareados, la que se usó para evaluar si dos grupos difieren entre sí de manera significativa (Spiegel, 1991).
- Corrección de Welch, aplicada en aquellos casos en que la Prueba  $t$  de Student de datos no pareados no cumplía con los requisitos de homocedasticidad de las varianzas.

El análisis de los resultados se realizó usando el programa computacional Graph Pad Prism (versión 4,0).

## 5. RESULTADOS

Se presentan los valores obtenidos como resultados del análisis de muestras de sangre, de orina y de mediciones en el volumen de orina excretado, ingesta de agua, consumo de concentrado y peso vivo de los grupos experimentales 1, 2 y 3.

El análisis estadístico se realizó intra grupos y entre grupos, considerándose en este último un efecto positivo en el tratamiento de *Bauhinia candicans*, al presentarse diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre este grupo y el diabético sin tratamiento.

De acuerdo a la hipótesis, en los gráficos se destacan las diferencias estadísticamente significativas obtenidas de la comparación entre los valores del grupo diabético sin tratamiento (grupo 2) con respecto al grupo diabético tratado (grupo 3): (\*).

## 5.1. GLICEMIA, GLUCOSURIA

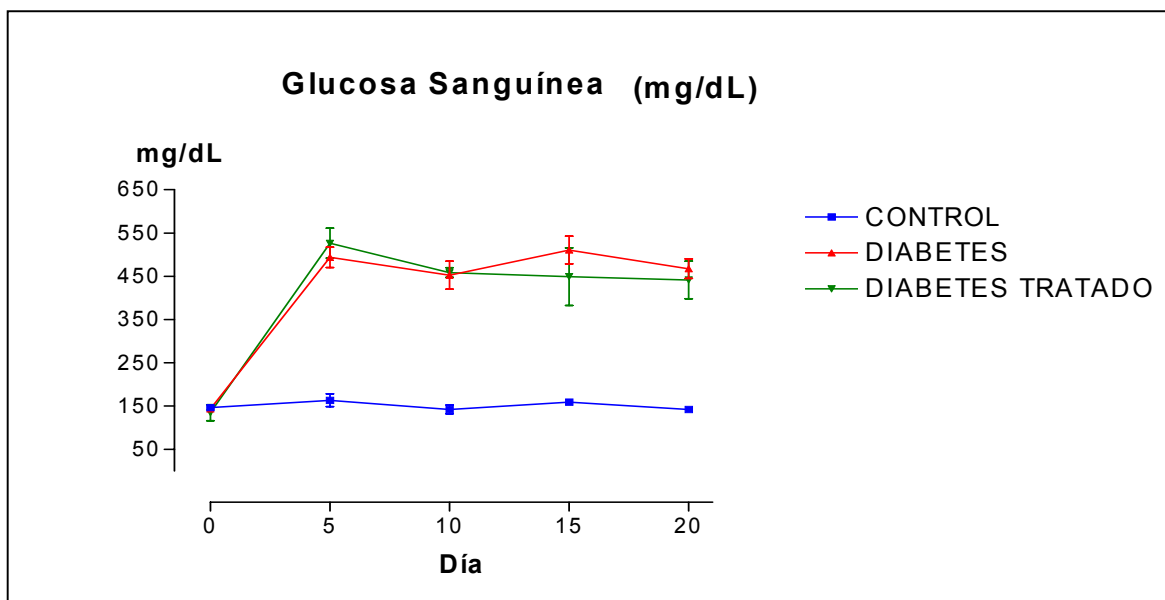


Gráfico N°1: Valores de Glicemia durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.

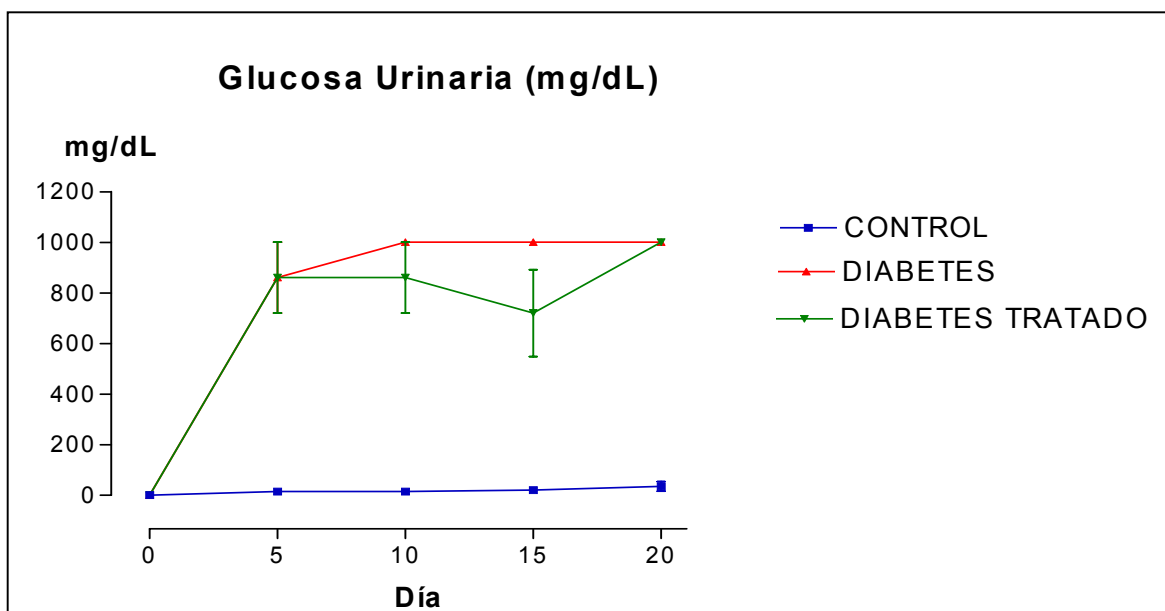


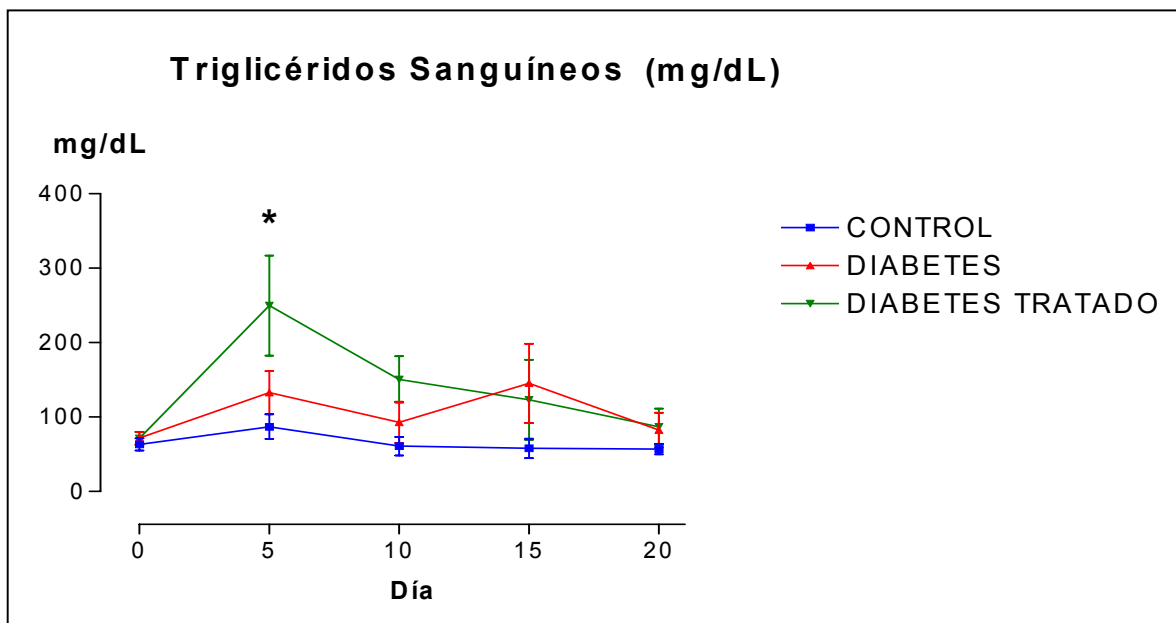
Gráfico N°2: Valores de Glucosuria durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.

El día 5 del estudio, en los grupos experimentales 2 y 3, se observa un gran aumento de la glicemia en relación a sus niveles basales y al grupo experimental 1. Este aumento es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos diabéticos (2 y 3) a lo largo de todo el período experimental ( $p > 0,05$ ).

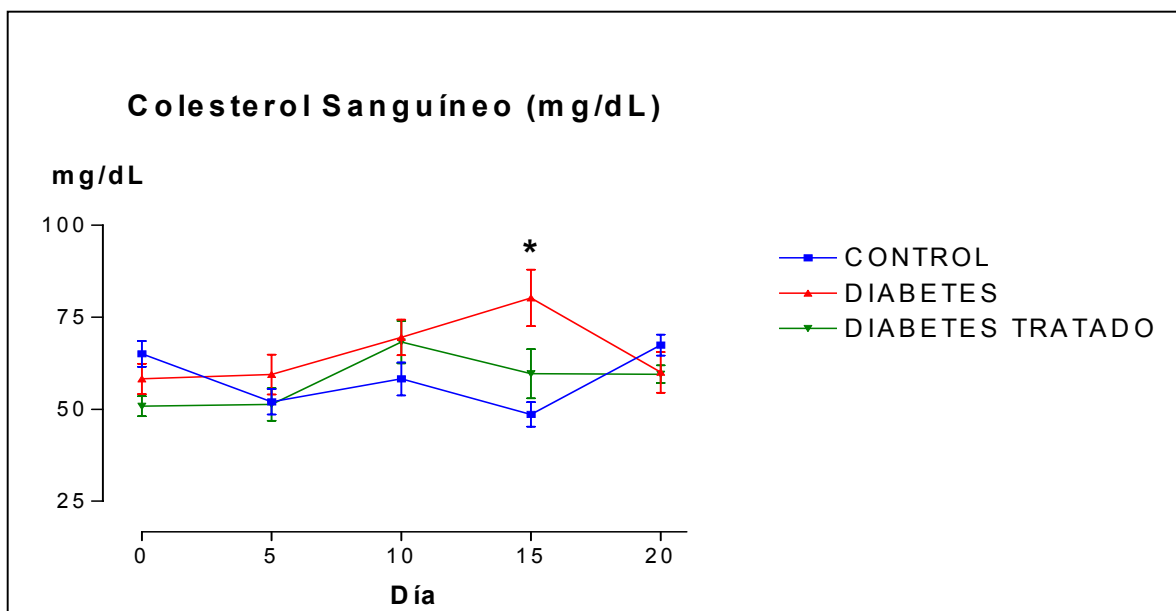
Se observa la presencia de glucosuria en los grupos diabéticos (2 y 3), a partir del día 5 del estudio, existiendo una diferencia estadísticamente significativa al compararlos con los valores del grupo control. Entre grupos diabéticos no se observan diferencias estadísticamente significativas.

## 5.2. TRIGLICÉRIDOS, COLESTEROL



\*:  $p < 0,05$

**Gráfico N°3:** Valores de Triglicéridos durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.



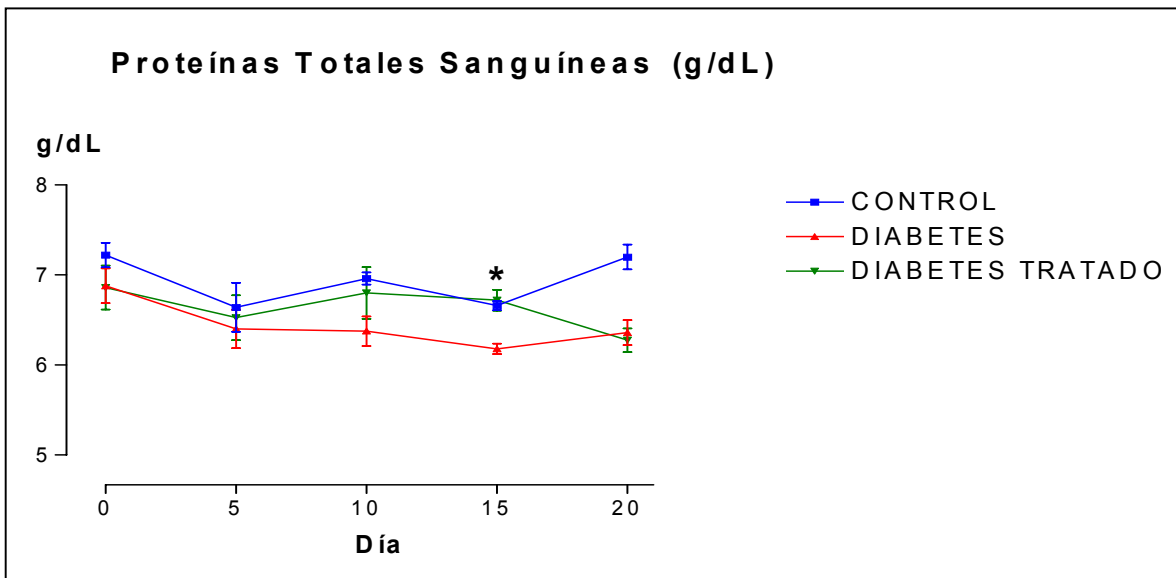
\*:  $p < 0,05$

**Gráfico N°4:** Valores de Colesterol durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.

Se observaron diferencias significativas en los valores de triglicéridos al comparar el grupo control con los grupos diabéticos 2 y 3 a partir del día 5 del estudio. Los días 5 y 20 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo diabético sin tratamiento y el grupo diabético tratado.

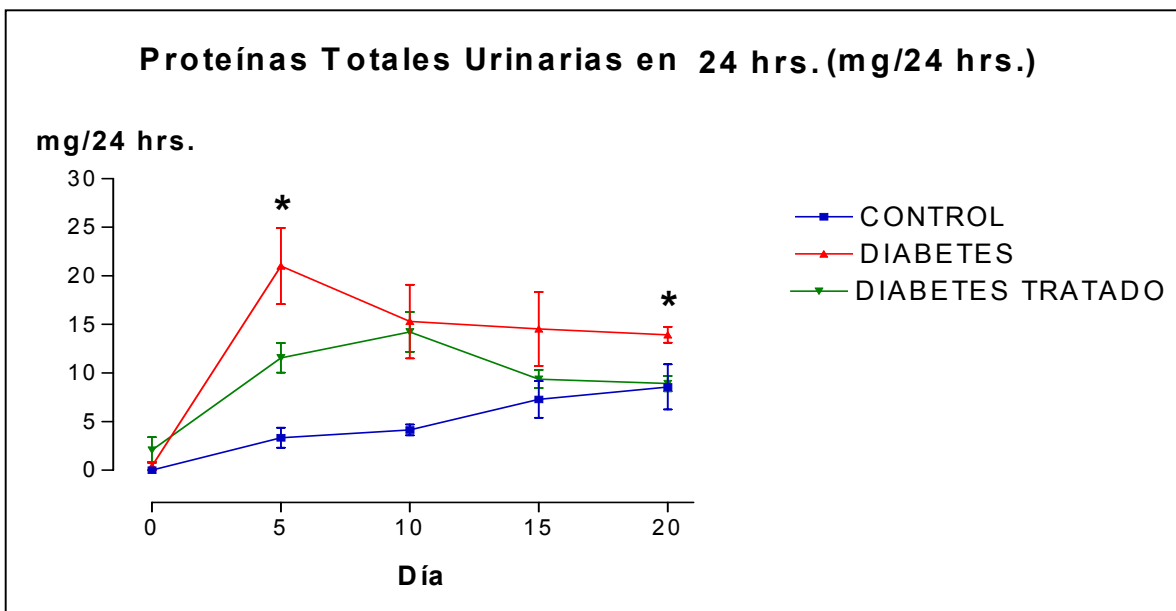
En cuanto al colesterol se observó, el día 15, una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo diabético tratado (3) y el grupo diabético no tratado (2).

5.3. PROTEÍNAS



\*p: < 0,05

Gráfico N°5: Valores de Proteínas totales en sangre durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.



\*p: < 0,05

Gráfico N°6: Valores de Proteinuria durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.



En el gráfico N°5, el día 15 del estudio el grupo diabético tratado tuvo valores similares a los obtenidos para el grupo control, en consecuencia, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo diabético tratado y el grupo diabético no tratado.

Para la proteinuria se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo diabético con tratamiento (3) y diabético sin tratamiento (2) los días 5 y 20 del período.

#### 5.4. CREATININA SANGUÍNEA, URINARIA, CLEARANCE DE CREATININA

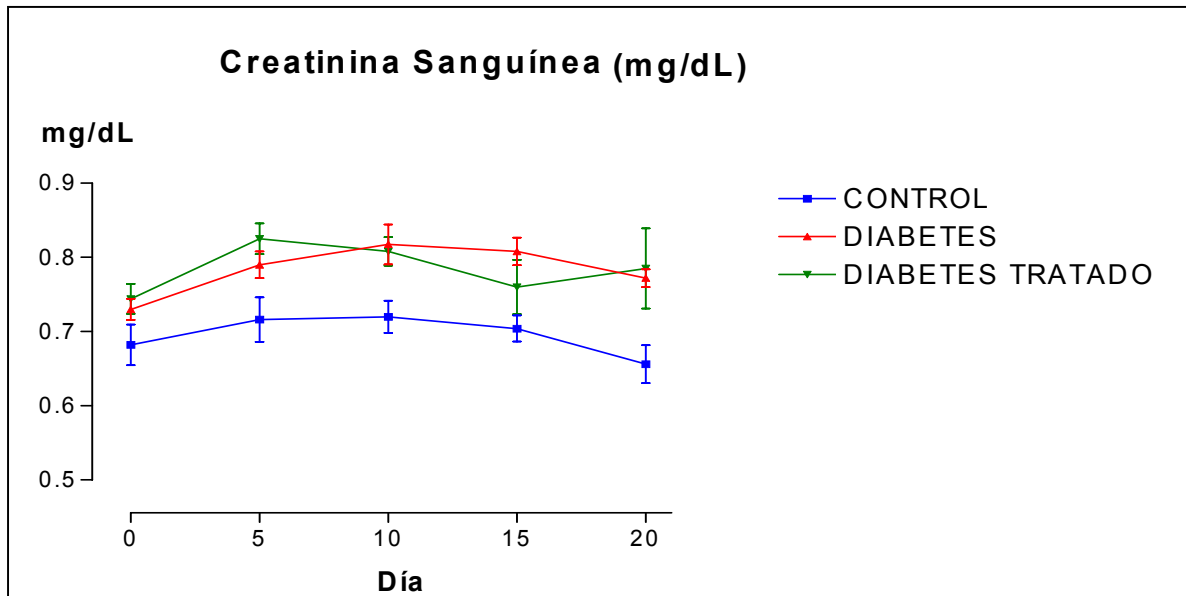


Gráfico N°7: Valores de Creatinina sanguínea durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.

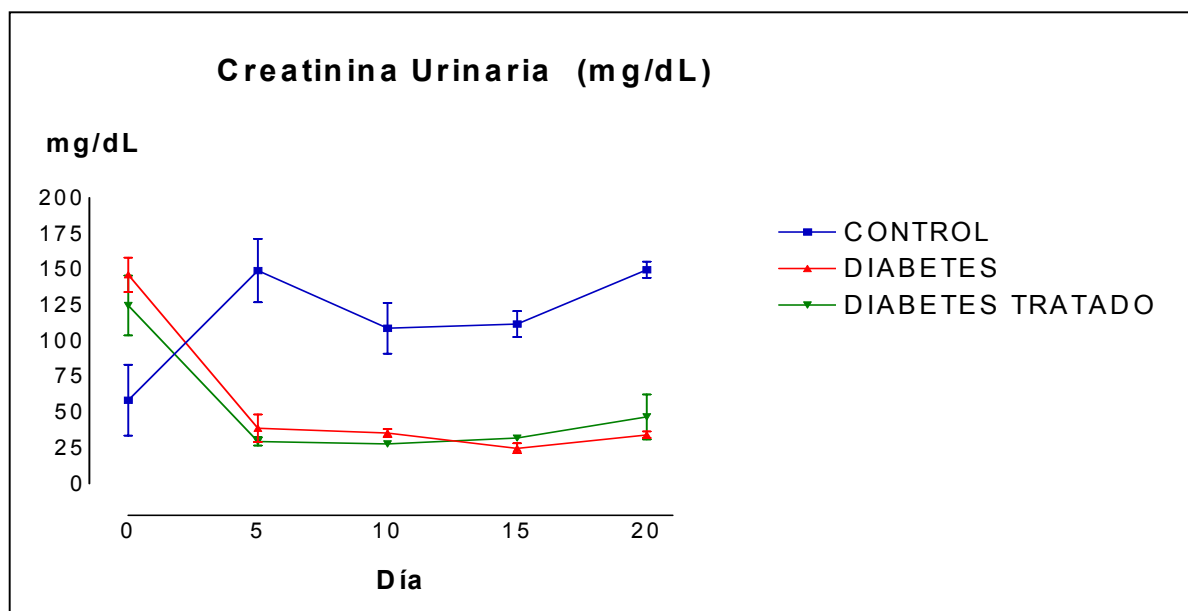
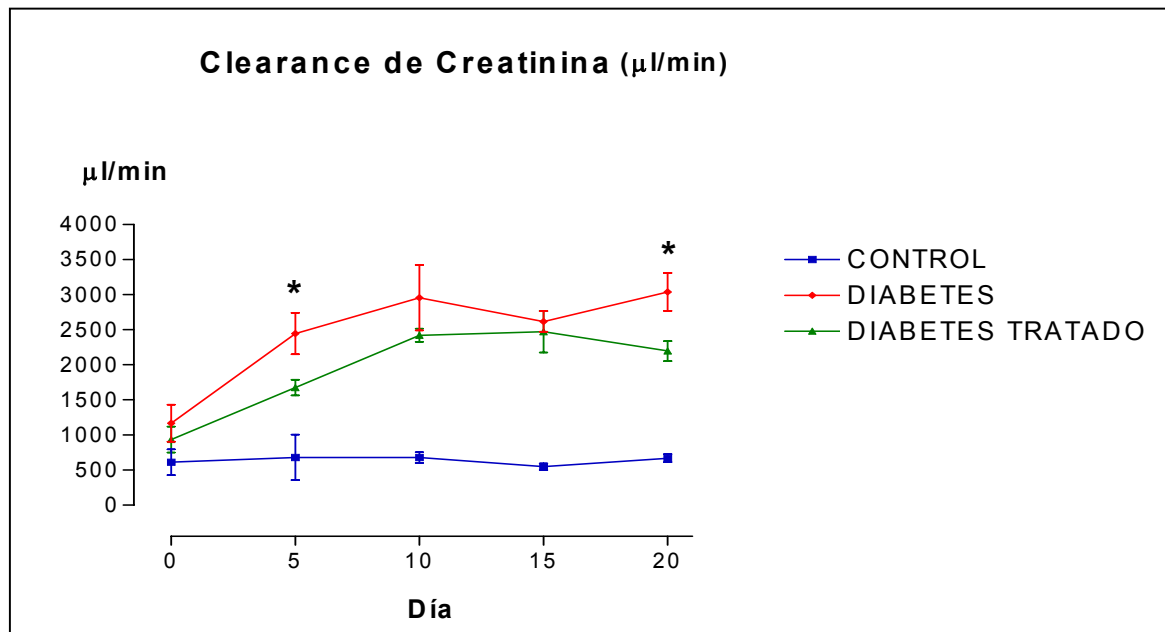


Gráfico N°8: Valores de Creatinina urinaria durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.



\*p: < 0,05

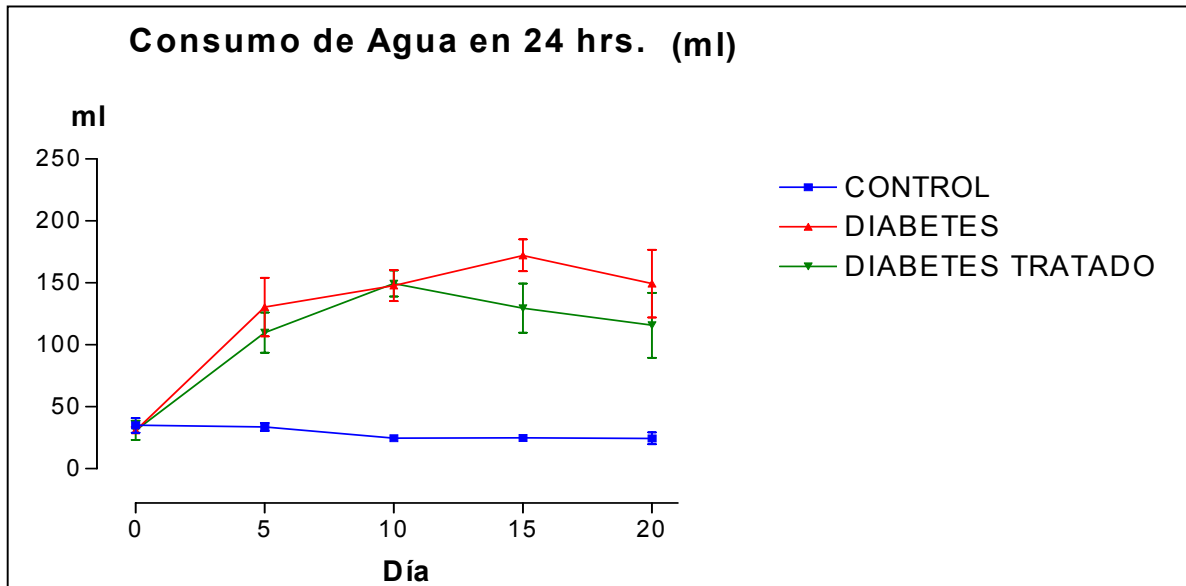
**Gráfico N°9: Clearance de creatinina durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.**

Al comparar los valores de creatinina sanguínea del grupo 1 con los grupos 2 y 3 se observaron diferencias significativas.

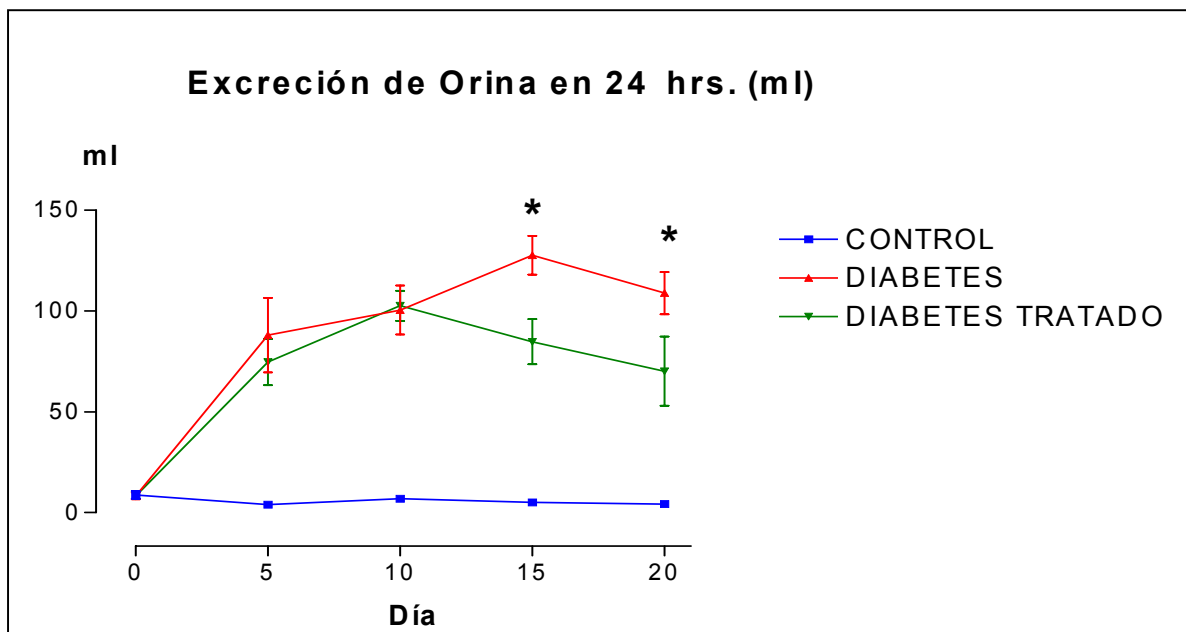
En cuanto a la creatinina urinaria (Gráfico N°8), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ( $p > 0,05$ ).

Los valores de clearance de creatinina del grupo diabético tratado fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) menores al compararlo con el grupo diabético no tratado los días 5 y 20 del estudio.

## 5.5. CONSUMO DE AGUA, EXCRECIÓN DE ORINA



**Gráfico N°10:** Consumo de agua en 24 hrs. durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.



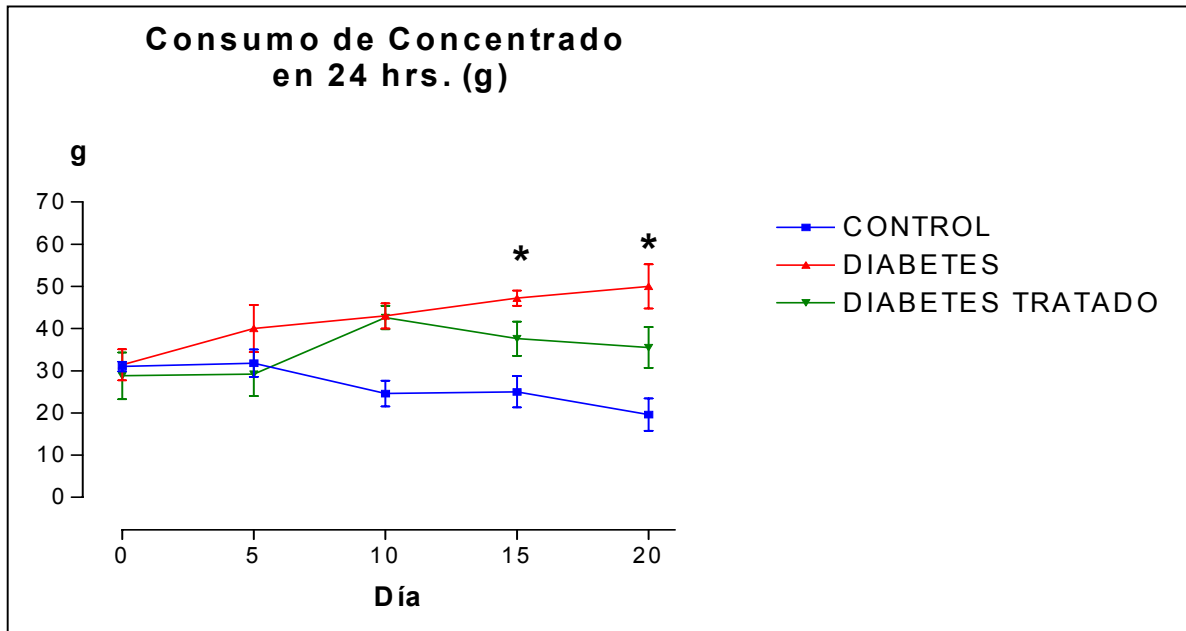
\*p: < 0,05

**Gráfico N°11:** Excreción de orina en 24 hrs. durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.

En cuanto a las diferencias del consumo de agua entre el grupo 1 y los restantes grupos experimentales (2 y 3), estas fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a partir del día 5 del estudio.

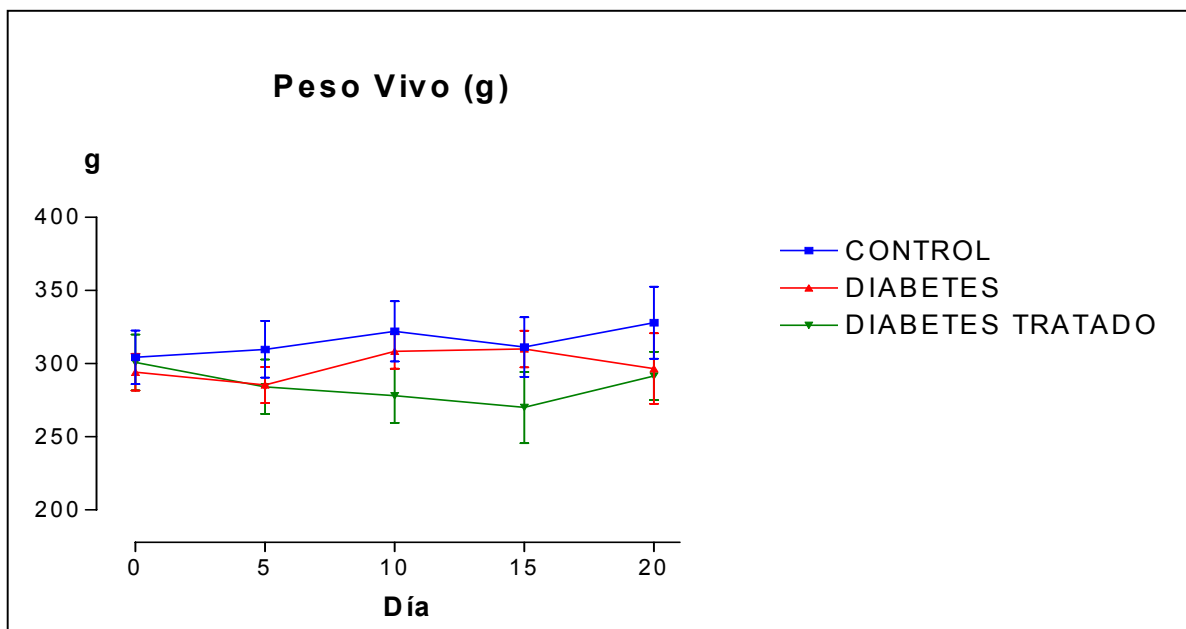
Desde el día 5 se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el volumen de orina excretada, al comparar el grupo control con los grupos diabéticos 2 y 3 ( $p < 0,05$ ). Las disminuciones observadas en los valores del grupo diabético tratado los días 15 y 20 fueron estadísticamente significativas comparadas al grupo diabético sin tratamiento.

## 5.6. CONSUMO DE CONCENTRADO, PESO VIVO



\*p: < 0,05

**Gráfico N°12: Consumo de concentrado en 24 hrs. durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.**



**Gráfico N°13: Variación del peso vivo durante un período de 20 días de observación por grupos control, diabetes sin tratamiento y diabetes tratado con *Bauhinia candicans*.**

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el consumo de concentrado del grupo 1 con los grupos 2 y 3.

El consumo de concentrado disminuyó significativamente los días 15 y 20 al comparar el grupo diabético tratado con respecto al grupo diabético sin tratamiento.

Las diferencias en el peso vivo fueron estadísticamente significativas al comparar el grupo 1 con los grupos 2 y 3.

## 6. DISCUSIÓN

Debido a que la diabetes mellitus es probablemente la enfermedad metabólica que ha tenido el más rápido crecimiento en el mundo y que cada vez se conoce más su naturaleza multifactorial y heterogénea, es que se hace necesaria una mayor variedad de terapias para su adecuado tratamiento. Muchas plantas en medicina tradicional han sido utilizadas por siglos para el tratamiento de la diabetes, pero sólo unas pocas han sido científicamente evaluadas (Ugochukwu y col., 2003). Es por esto que en el presente trabajo se estudió el efecto hipoglicemiante de *Bauhinia candicans*, y para ello se utilizó el modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ), uno de los más utilizados para estos fines (Al-Achi y Greenwood, 2001; Yokozawa y col., 2002; Kamalakkanan y col., 2003).

### 6.1. GLICEMIA Y GLUCOSURIA

Previo a la inducción de diabetes, las ratas fueron sometidas a un control de valores sanguíneos para determinar si se encontraban dentro de los rangos de referencia para la especie. Aunque los rangos de glicemia basales presentados en el Gráfico N°1 son superiores al máximo establecido para la especie según Kaneko (1997) y Zanoello y col. (2002), que indican un rango entre 47,7 y 107 mg/dL, coinciden con los resultados de muchos estudios en que los niveles basales de glicemia estarían por sobre estos valores: Nachar (1994), indica un rango de  $119,15 \pm 6,64$  a  $122,05 \pm 7,52$  mg/dL; Saso y col. (2000), niveles de aproximadamente 120 mg/dL; Shenoy y Goyal (2002), valores promedio de  $143,6 \pm 9,2$  mg/dL; Kędziora-Kornatowska y col. (2003), un rango entre  $114,0 \pm 7,9$  y  $116,7 \pm 9,4$  mg/dL; Pepato y col. (2003), valores desde  $135 \pm 0,02$  a  $139 \pm 0,02$  mg/dL. Este aumento de los niveles basales de glicemia serían atribuidos a las condiciones de manejo de los animales, específicamente al alimento, ya que no existe una estandarización de los componentes de la ración en estudios de glicemia en ratas. Se evitó el estrés de los animales al momento de la obtención de la muestra de sangre, de manera de descartar falsas hiperglicemias, condicionadas por el estímulo de catecolaminas.

A las 72 hrs. post-administración de STZ, las ratas experimentaron un alza de los valores de glicemia de alrededor de 350% en comparación a sus basales. Esto coincide con Lemus y col. (1999), que indican alzas de  $120,05 \pm 5,78$  a  $510,42 \pm 9,91$  mg/dL en el mismo período de tiempo posterior a la administración de STZ, es decir, alzas de aproximadamente un 400%. La mantención de la hiperglicemia en el grupo diabético sin tratamiento, corrobora la acción de la STZ como inductor de diabetes. La importancia de estandarizar la dosis de STZ radica en que se valida el método para usarlo en futuras investigaciones, siguiendo el mismo protocolo experimental, ya que según Soares y col. (2000) la respuesta hiperglicémica a las distintas drogas diabetogénicas es extremadamente variable. Esta variación es atribuida, entre



otros, a las diferentes cepas de ratas utilizadas en los protocolos o a las distintas partidas de inductores químicos de diabetes, ya que una misma dosis utilizada en distintos estudios produce resultados diferentes en términos de glicemia.

Con respecto a los valores de glicemia obtenidos en el grupo diabético tratado con extracto fluido de *Bauhinia candicans* (Gráfico N°1), se observa una tendencia a la disminución desde el día 10 al 20, la que se hace mayor el día 15. Esta tendencia nos sugiere que usando un mayor número de individuos por grupo, podrían evidenciarse diferencias significativas entre el grupo diabético sin tratamiento y el grupo diabético tratado. Además, debido a que se desconoce la cinética del extracto en ratas, se deben considerar variables como la frecuencia de administración (dosis múltiples), la concentración (dosis altas), y un posible efecto acumulativo del extracto, como en el caso de *Smallantus sonchifolius*, que sólo después de un tratamiento de 30 días de infusión al 2% ad-libitum, muestra efectos hipoglicemiantes significativamente favorables (Aybar y col., 2001).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los de Soares y col. (2000), en el que se administró por 21 y 40 días una infusión de esta misma planta preparada con 20 g de hojas secas en 1 litro de agua a una temperatura de aproximadamente 80°C, administrada ad libitum, donde los valores de glicemia obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo diabético sin tratamiento.

En 1999, un estudio realizado en la Universidad de Chile por Lemus y col., demuestra el efecto hipoglicemiante en un período comprendido entre 1 y 3 horas post-administración de una infusión de *Bauhinia candicans* preparada con 200 g de planta/litro de agua hirviendo, lográndose la máxima actividad hipoglicemiante a las 2 horas con una reducción de glicemia comparada con el grupo diabético sin tratamiento de un 22%. El éxito logrado en este estudio se podría deber al corto período de tiempo entre la administración de la infusión de la planta y el análisis de la glicemia. En este caso, la biotransformación y la excreción del compuesto responsable del efecto hipoglicemiante aparentemente son rápidos. Sin embargo, se debe tener en consideración que las ratas utilizadas fueron de cepa Wistar (las que pueden diferir de las Sprague Dawley en su metabolismo y rangos referenciales sanguíneos), y que las hojas de la planta fueron recolectadas en una época del año que puede diferir del extracto fluido utilizado en este estudio, ya que según Evans (1996), esta concentración puede variar con la época del año y el lugar de recolección.

De acuerdo a Guyton y Hall (1997), una persona normal pierde cantidades indetectables de glucosa por la orina, mientras que una persona con diabetes pierde glucosa en cantidades pequeñas o grandes, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de la ingestión de carbohidratos. Durruty y García (1992), explican la pérdida de glucosa por orina: siempre que la cantidad de glucosa que llega a los túbulos renales por el filtrado glomerular se eleve por sobre un nivel crítico, una proporción significativa del exceso de glucosa no puede ser reabsorbido y se excreta por orina. Este nivel crítico denominado “umbral” de aparición de glucosa en la orina (umbral renal) no es una constante, sino que varía de un individuo a otro (Figuerola, 1997).

El nivel de glucosa en sangre, el flujo sanguíneo glomerular, el índice de reabsorción tubular y el flujo urinario influyen en la aparición de glucosuria; se considera como umbral renal para el humano niveles de 180 a 200 mg/dL (Schumann y Schweitzer, 1993), en perro niveles de 180-220 mg/dL y en el gato niveles cercanos a los 300 mg/dL (Ettinger y Feldman, 1997).

A las 48 hrs. post-administración de STZ aparece glucosuria en la orina de las ratas y por lo tanto el estado de hiperglicemia aparece antes de los 2 días post-aplicación, siendo este parámetro usado también como referencia del estado diabético (Boros y col., 1998; Bardoux y col., 1999; Lee y Kim, 2000). Al igual que en este trabajo, los cambios de glucosuria fueron observados por Shenoy y Goyal (2002) y Akhani y col. (2004), quienes aplicaron STZ a igual dosis y vía de administración, obteniendo niveles de glucosuria mayores a 2 g/dL.

El grupo diabético tratado (grupo 3) no presentó diferencias estadísticamente significativas en la glucosuria con respecto al grupo diabético sin tratamiento (grupo 2), sin embargo, se observó una clara tendencia a la disminución mediada por la administración del extracto (Gráfico N°2). Cabe destacar que las tiras reactivas utilizadas (Human Test Combina 10 M de Laboratorio Human) entregan un resultado máximo de glucosuria de 1000 mg/dL, por lo que niveles superiores a esta cifra pueden ser subestimados, por lo tanto, es posible que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos diabéticos 2 y 3 por una subestimación en los niveles de glucosuria del grupo experimental 2, en el que se observaron desde el día 10 en adelante valores de 1000 mg/dL.

## **6.2. TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL**

La diabetes está asociada a cambios en el metabolismo de los lípidos (Shenoy y Goyal, 2002; Ugochukwu y col. 2003). Debido a la falta de insulina, la enzima lipasa sensible a hormona se activa enérgicamente, provocando hidrólisis de los triglicéridos almacenados, con lo que se liberan grandes cantidades de ácidos grasos y de glicerol a la sangre. En consecuencia, la concentración de ácidos grasos libres comienza a elevarse en minutos. El exceso de éstos en el plasma promueve la conversión hepática de parte de los ácidos grasos en fosfolípidos y colesterol, dos de los principales productos del metabolismo de los lípidos (Guyton y Hall, 1998). Estas dos sustancias, junto con el exceso de triglicéridos formado al mismo tiempo por el hígado, se eliminan a la sangre en las lipoproteínas (Durruty y García, 1992). Esta elevada concentración de lípidos, especialmente de colesterol, determina el rápido desarrollo de aterosclerosis en pacientes con diabetes grave (Guyton y Hall, 1997).

Los niveles de triglicéridos (Gráfico N°3) del grupo control y los basales de los grupos diabéticos 2 y 3 coinciden con los establecidos para ratas controles según Tsao y col. (1998) y Kusunoki y col. (2000), quienes indican valores de  $64 \pm 5$  a  $67 \pm 5,6$  y  $72 \pm 6$  a  $104 \pm 5$  mg/dL, respectivamente.

La diferencia significativa entre los valores del grupo control y los grupos diabéticos con y sin tratamiento, demuestran que el modelo de diabetes experimental por STZ efectivamente produce cambios en el metabolismo de los lípidos, tal como los resultados obtenidos por Umrani y Goyal (2002), Anwar y Meki (2003), Ugochukwu y col. (2003), Akhani y col. (2004).

A pesar que los resultados para triglicéridos son los esperados en el grupo control y en el diabético sin tratamiento, sorprende el aumento significativo de los triglicéridos en el grupo tratado con *Bauhinia candicans*. Esto se debe a las características del extracto (excipientes), ya que el alcohol interfiere en el metabolismo de los triglicéridos (Kaneko, 1997).

Con respecto a los valores basales de colesterol obtenidos de los tres grupos experimentales (Gráfico N°4), se acercan a los de Soares y col. (2000), Shenoy y Goyal (2002) y Pepato y col. (2003), quienes indican como niveles basales de colesterol en ratas 58,19 mg/dL,  $58,6 \pm 8,6$  mg/dL y  $52 \pm 0,01$  mg/dL, respectivamente.

En los niveles de colesterol se obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos diabético con tratamiento y diabético no tratado sólo el día 15 del estudio. Esto coincide con un aumento significativo en los niveles de colesterol del grupo diabético sin tratamiento, marcando el inicio de la alteración en el metabolismo lipídico, y por lo tanto una mayor gravedad del estado diabético que en el grupo tratado (3), el cual probablemente respondió a partir de ese momento positivamente al tratamiento con el extracto. El día 20, el grupo 2 presenta una disminución en los niveles de colesterol, debido a que una de las ratas presentaba muy comprometido su estado general, obteniéndose de su muestra un valor inferior a los considerados como controles por Soares y col. (2000), Shenoy y Goyal (2002) y Pepato y col. (2003) (Anexo 3). Esto podría explicar que las diferencias significativas entre el grupo diabético no tratado (2) y el grupo control (1) observadas el día 15, se revirtieran el último día del estudio

Wasan y col. (1998), administraron IV 55 mg/Kg y 100 mg/Kg de STZ, en las ratas inducidas con 55 mg/Kg no se observaron diferencias estadísticamente significativas para el colesterol entre el grupo control y el diabético, pero sí se observaron diferencias significativas en ratas inducidas con 100 mg/Kg, con lo que se demuestra una relación entre la severidad del estado diabético y las modificaciones en los valores de colesterol.

Otra variable a considerar es la cronicidad del estado diabético que también influye sobre el metabolismo lipídico. Degenhardt y col. (2002) y Shenoy y Goyal (2002), usando 45 mg/kg de STZ, IV, obtuvieron alzas significativas de los niveles de colesterol en ratas diabéticas entre 6 y 28 semanas post-inducción. Queda demostrado que las variaciones en los niveles de colesterol son a largo plazo, por lo que 20 días no son suficientes para demostrar que *Bauhinia candicans* es útil para regular los niveles de colesterol.

En los grupos diabéticos sin tratamiento (2) y diabético tratado (3), el aumento de los triglicéridos y la mantención dentro del rango en los niveles de colesterol (a excepción del día

15 en el grupo 2), respaldarían a Durruty (1992), el cual mencionó a la hipertrigliceridemia como la anormalidad más común de los lípidos en la diabetes.

### 6.3. PROTEÍNAS

En la diabetes, casi todo el almacenamiento de proteínas se detiene (Guyton y Hall, 1997). El catabolismo proteico aumenta, la síntesis proteica se detiene y la concentración plasmática de aminoácidos se eleva considerablemente; la mayor parte de este exceso de aminoácidos se utiliza directamente para obtener energía o como sustrato para la neoglucogénesis (Durruty y García, 1992; Guyton y Hall, 1997). Esta degradación de los aminoácidos también provoca un aumento de la excreción de urea por la orina. La pérdida de proteínas resultante es uno de los efectos más graves de la diabetes mellitus, pudiendo determinar una extrema debilidad, así como alteración de muchas funciones de los órganos (Guyton y Hall, 1997).

Los valores de proteínas totales en sangre del grupo control y los basales de los grupos diabéticos 2 y 3 (Gráfico N°5), se acercan a los obtenidos por Saso y col. (2000), Watcho y col. (2004) y a los considerados como dentro del rango establecido para la especie ( $7,5 \pm 0,27$  g/dL) por Kaneko (1997).

En el Gráfico N°5 se observa una diferencia entre los niveles basales de proteínas séricas de los tres grupos experimentales, esta diferencia no es estadísticamente significativa lo que valida estos resultados como normales. La disminución significativa en los niveles de proteínas séricas del grupo diabético sin tratamiento (día 5) se observó antes de lo citado por Saso y col. (2000), quienes obtuvieron diferencias a los 2 meses post-aplicación de STZ.

El día 15, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo diabético tratado (3) y el grupo diabético no tratado (2), siendo incluso los valores del grupo 3 iguales a los valores del grupo control, lo que indica una normalización en la alteración sobre el metabolismo proteico.

Es normal encontrar una pequeña cantidad de proteínas en la orina de todas las especies (Finco, 1997; Davies, 2000). La cantidad encontrada se debe a que no toda la proteína filtrada por el glomérulo es reabsorbida por el túbulo proximal (Finco, 1997). Cuando la proteinuria se encuentra sobre el valor considerado como normal, es siempre considerada patológica (Kraft y Schillinger, 1999). La proteinuria debida a alteración glomerular es a menudo relativamente selectiva, siendo la albúmina el principal componente de proteína urinaria (Finco, 1997), la que es un indicador fiable de alteración renal inicial, además de ser un factor de riesgo de nefropatía diabética clínica (Schumann y Schweitzer, 1993; Burne y col., 1998).

Con respecto a la proteinuria, Fischer y col. (1998) y Tschope y col. (1999), obtuvieron niveles basales entre  $7,9 \pm 1,6$  y  $8,3 \pm 1,7$  mg/24 hrs., respectivamente, con lo que se

demuestra que a pesar de observarse un aumento en el grupo control (Gráfico N°6), los valores se encuentran dentro de los rangos normales.

El aumento estadísticamente significativo intra grupos, demuestra que existe una tendencia por parte de los grupos diabéticos a aumentar la excreción de proteínas, debido probablemente a un aumento en la tasa de filtración glomerular y con esto a un aumento en la filtración de albúmina, antesala del estado de nefropatía diabética (Esmatjes, 2001).

Al comparar los valores de excreción urinaria de proteínas en 24 hrs. entre grupos diabéticos (Gráfico N°6) se observaron diferencias estadísticamente significativas los días 5 y 20, lo que evidencia una probable actividad regulatoria del extracto de *Bauhinia candicans* sobre la excreción de proteínas urinarias, condicionando un retraso en la aparición de los problemas renales. Considerando que la hiperglicemia produce un aumento del filtrado glomerular, directamente por efecto osmótico o indirectamente por aumento de la síntesis de hormonas o sustancias vasoactivas (Amado y Salas, 1995; McPhee y col., 2000; Esmatjes, 2001), sería interesante en estudios posteriores investigar a través de cuál de estos mecanismos actuaría el extracto fluido, condicionando el efecto protector observado y por lo tanto disminuyendo la presentación de nefropatía diabética.

La nefropatía diabética es una de las complicaciones más temidas de la diabetes mellitus, ya que actualmente es la primera causa de diálisis en Estados Unidos (McPhee y col., 2000). La importancia de saber cuáles son las proteínas que se eliminan por orina radica en que hay una correlación directa entre albuminuria, hipertensión arterial e insuficiencia renal progresiva (Valdivieso, 1992).

#### **6.4. CREATININA Y CLEARANCE DE CREATININA**

La creatinina es un desecho metabólico que se forma en el músculo por la degradación de la fosfo-creatina, en cantidad proporcional a la masa muscular. La creatinina es eliminada del organismo por vía renal, siendo retirada del plasma por filtración glomerular. Su medición es útil en el diagnóstico de diversas nefropatías (Verlander, 1999).

Los pacientes diabéticos con nefropatía clínica, en que existe una excreción urinaria de albúmina mayor a 300 mg/24 horas, presentan una caída del filtrado glomerular superior al 50%, detectándose elevaciones de creatinina sérica (Esmatjes, 2001). Una vez que comienza la fase de macroalbuminuria, la función renal disminuye de un modo constante, produciéndose en promedio un descenso mensual de la filtración glomerular de 1 ml/min. en el humano (Valdivieso, 1992; Foster, 1998).

El rango de creatinina sérica establecido para las ratas varía de 0,40 mg/dL a 3,75 mg/dL (Kaneko, 1997). A pesar que el Gráfico N°7 muestra diferencias significativas al comparar los valores de creatinina sérica del grupo control con los valores de los grupos diabéticos 2 y 3, los resultados obtenidos se ubican dentro del rango establecido para la

especie según Kaneko (1997), lo que concuerda con el descarte de una nefropatía clínica mencionada anteriormente en excreción de proteínas urinarias. Jyothirmayi y col. (2001), a las 8 semanas post administración de STZ, no observó aumentos significativos en los niveles de creatinina sérica, y Degenhardt y col. (2002), observó aumentos significativos aproximadamente a las 17 semanas post-administración de 45 mg/Kg de STZ, vía IV.

Los pacientes con DMID presentan, al inicio de su enfermedad, un aumento de la filtración glomerular. Es así que se ha determinado que en humanos el clearance de creatinina se eleva desde un valor promedio de 123 ml/min en sujetos normales a 142 ml/min en diabéticos con evoluciones de la enfermedad inferiores a 5 años (Morales, 1992; Esmatjes 2001).

Los resultados para el clearance de creatinina (Gráfico N°9), muestran un aumento significativo cuando se compara al grupo control (1) con los grupos diabéticos 2 y 3. Tal aumento ha sido descrito en ratas diabéticas inducidas con STZ anterior a un desarrollo de nefropatía clínica (Reddi y Camerini-Davalos, 1990; Jyothirmayi y col., 2001). Además se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos diabético tratado (3) y diabético no tratado (2) los días 5 y 20, lo que coincide con la disminución significativa en la excreción de proteínas urinarias. Esto confirma lo anteriormente descrito con respecto al efecto protector del extracto sobre riñón, pues el clearance como medida de funcionalidad renal tiende a corregirse.

## **6.5. SIGNOS CARDINALES DE DIABETES**

En el diabético y en el sujeto sano, la homeostasis de los carbohidratos, lípidos y proteínas es función primaria de las hormonas (insulina, glucagón, hormona del crecimiento, glucocorticoides, entre otras) y de la sensibilidad de los tejidos a ellas, del estado nutricional de los sujetos y de la actividad física. Estos factores operan simultáneamente e interactúan unos con otros, y su alteración genera en los diabéticos la sintomatología clásica (Durruty y García, 1992).

Los signos clásicos de la diabetes, según Jara y col. (2001) también denominados “signos cardinales”, consisten en poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y astenia (Guyton y Hall, 1997; Foster, 1998; Velásquez, 2001). Hace algunos años, estos signos eran considerados muy frecuentes, pero en la actualidad se presentan con mucha menor frecuencia, gracias a un mayor conocimiento y cultura de la población que les hace consultar antes de que se presente toda la sintomatología clásica de la diabetes (Jara y col., 2001).

### **6.5.1. Poliuria y polidipsia**

La poliuria consiste en la eliminación excesiva de orina (Guyton y Hall, 1997; Jara y col., 2001). Cuando la concentración de glucosa sanguínea sobrepasa su umbral renal, comienza a aparecer glucosuria. La glucosa en la orina debe ser solubilizada, necesitando más

agua y aumentando así la diuresis hasta cuatro o seis litros por día en el humano (Jara y col., 2001). Esta excesiva pérdida de agua, conduce a una deshidratación hipertónica, lo que lleva a una hiperosmolaridad plasmática que estimula los osmorreceptores en el hipotálamo anterior provocando sed, con el consecuente aumento de la ingestión hídrica (polidipsia) (Durruty y García, 1992; Guyton y Hall, 1997; Meric, 1997; Jara y col., 2001).

En ratas, la inducción de diabetes experimental con STZ aumenta significativamente el volumen de orina excretada y de agua ingerida (Murali y Goyal, 2001; Grover y col., 2003). La diuresis aumentó significativamente en los grupos 2 y 3 (Gráfico N°11), siendo este aumento aproximadamente 10 veces mayor que los valores de volumen de orina basales. Este aumento coincide con los estudios de Pepato y col. (2003) y Jyothirmayi y col. (2001) quienes observaron un aumento en igual magnitud. Además, se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo diabético tratado comparado al grupo diabético sin tratamiento los días 15 y 20, lo que evidencia una disminución en la magnitud de este signo clínico.

En cuanto a los valores de ingesta de agua, estos se acercan a los de Boros y col. (1998) y Akhani y col. (2004), quienes consideran como volumen de agua ingerida para ratas sanas niveles de  $38 \pm 8$  ml y  $22 \pm 3,5$  ml y para ratas diabéticas inducidas por STZ niveles de  $161 \pm 60$  ml y  $107 \pm 4,6$  ml, respectivamente, correspondiendo a niveles de glicemia en ratas controles aproximadamente  $76,1 \pm 3,1$  mg/dL y en ratas diabéticas aproximadamente  $231,1 \pm 7,8$  mg/dL.

A pesar que en los días 15 y 20 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos diabéticos 2 y 3 para la excreción de orina y no para el consumo de agua, existe una relación entre ambos factores, ya que ambas gráficas (Gráfico N°10 y N°11) siguen la misma tendencia.

Al hacer una correlación entre los valores de glicemia (Gráfico N°1) y los volúmenes de ingesta de agua y de orina excretada, es posible observar una tendencia similar desde el día 10 en adelante, por lo que se concluye que la variación en estos últimos niveles, es simplemente el resultado de la severidad en que se presenta la diabetes.

Cabe señalar que Soares y col. (2000), no encontraron diferencias significativas en el consumo de agua entre ratas diabéticas inducidas por aloxano y tratadas con infusión de *Bauhinia candicans*. Estos resultados coinciden con los del presente estudio, sin embargo, es importante destacar la disminución estadísticamente significativa que se presenta a partir del día 15 en la excreción de orina en el grupo diabético tratado, lo que evidencia una menor severidad de estos signos cuando las ratas son tratadas con extracto y no con infusión de *Bauhinia candicans*.

### 6.5.2. Polifagia

La polifagia consiste en el aumento de apetito con necesidad de comer con más frecuencia que lo habitual, especialmente alimentos hidrocarbonados, con objeto de

compensar las pérdidas urinarias de glucosa y tratar de aumentar los valores de glicemia para su transporte a las células. Se produce ante un déficit de glucosa intracelular, que produce sensación de hambre y estimula el centro del apetito (Jara y col., 2001).

En el presente estudio existe un aumento sostenido en el tiempo del consumo de concentrado en ratas diabéticas sin tratamiento, este cambio fue significativamente disminuido por el extracto de *Bauhinia candicans* en el grupo diabético tratado los días 15 y 20 del estudio (Gráfico N°12), lo que concuerda con la tendencia a disminuir la severidad de los signos clínicos de la diabetes mencionada anteriormente.

### 6.5.3. Pérdida de peso vivo

La pérdida de peso es un signo cardinal típico de la DMID (Jara y col., 2001). Éste se produce por la ineficacia del metabolismo glucídico, proteico y graso, ante la falta o disminución importante de insulina (Guyton y Hall, 1997). Aumenta la lipólisis, la gluconeogénesis, se metaboliza mal la glucosa y se pierde por la orina. Todo ello produce adelgazamiento, signo importante de la necesidad de insulina. Sin embargo, en la DMNID, como aún poseen reserva importante de insulina (o incluso niveles altos), suele haber tendencia a la obesidad, que acentúa más el proceso de resistencia insulínica característico de este tipo de diabetes (Jara y col., 2001).

A pesar de observarse disminución sostenida del peso en el grupo diabético tratado (Gráfico N°13), las variaciones fueron erráticas probablemente debidas a diferencias individuales. Para finalizar, el peso vivo de los animales del grupo diabético tratado bajó sostenidamente a partir del día 5 y sorpresivamente comenzó a normalizarse el día 20 del estudio, esto nos sugiere que la reversión del adelgazamiento es una variable más crónica que las anteriores y que por lo tanto se necesitan estudios que se prolonguen por períodos de tiempo superiores a los 20 días.

Las diferencias estadísticamente significativas observadas entre el grupo diabético sin tratamiento y el grupo diabético tratado con extracto fluido de *Bauhinia candicans*, abren un interesante campo para futuras investigaciones en fitoterapia. Debido a que actualmente existe una conciencia mundial de que los elementos naturales podrían tener ventajas con respecto a elementos sintetizados artificialmente, y la constatación de que muchas plantas medicinales usadas en medicina popular tienen principios activos de comprobado efecto, el interés por las plantas medicinales como posible tratamiento para las diversas enfermedades existentes ha ido en aumento (Campos, 1998), por lo que futuros estudios en los efectos del extracto fluido de *Bauhinia candicans* serían un interesante aporte en esta materia.



## 7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y discutidos en el presente estudio, se concluye:

La administración IV de STZ en dosis única de 45 mg/Kg de peso vivo en ratas adultas procedentes del bioterio de Fisiología de la Universidad Austral de Chile, es efectiva en la inducción de DMID.

La administración p.o. (sonda bucoesofágica) durante 20 días de extracto fluido de *Bauhinia candicans* (250 mg/rata) a ratas diabéticas inducidas con STZ, si bien demostró una tendencia a la disminución de la glicemia, esta no es estadísticamente significativa por lo se rechaza la hipótesis planteada.

Durante algunos días del estudio se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de colesterol, proteínas sanguíneas, proteínas urinarias y clearance de creatinina, entre el grupo de ratas tratadas con extracto fluido de *Bauhinia candicans* y el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento.

Hacia el término del estudio (días 15 y 20), el tratamiento con extracto fluido de *Bauhinia candicans* produce disminuciones significativas en los niveles de excreción de orina y consumo de concentrado al compararlas con el grupo diabético sin tratamiento, y una clara tendencia a la disminución en el consumo de agua, de lo que se deduce un control en la expresión de estos signos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- AKHANI, S., S. VISHWAKARMA, R. GOYAL. 2004. Anti-Diabetic Activity of *Zingiber officinale* in Streptozotocin-Induced Type I Diabetic Rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 101-105.
- AL-ACHI, A., R. GREENWOOD. 2001. A Brief report on some physiological parameters of streptozotocin-diabetic rat. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27: 465-468.
- AMADO, J.A., E. SALAS. 1995. Fisiopatología del metabolismo de los hidratos de carbono en Patología General. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid. España.
- ANWAR, M., A. MEKI. 2003. Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Garlic Oil and Melatonin. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 135: 539-547.
- ARTEAGA, A. 1992. La diabetes mellitus en el momento actual. *Boletín Esc. de Medicina de P. Universidad Católica de Chile.* 21: 4-6.
- ARTISS, J.D., B. ZAK. 1997. Measurement of Cholesterol Concentration en Handbook of Lipoprotein Testing. AACC Press. Washington.
- ARUN, N., N. NALINI. 2002. Efficacy of tumeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant foods hum. Nutr.* 57: 41-52.
- AYBAR, M.J., A.N. SÁNCHEZ, A. GRAU, S.S. SÁNCHEZ. 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 74: 125-132.
- BARDOUX, P., H. MARTIN, M. AHLLOULAY, F. SCHMITT, N. BOUBY, M. TRINH-TRANG-TAN, L. BANKIR. 1999. Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: Study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10397-10402.
- BAYNES, J., M. DOMINICZAK. 1999. Medical biochemistry. Mosby, London. England.
- BOLZAN, A., M. BIANCHI. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat. Res.* 512: 121-134.
- BOROS, I., P. KESZLER, G. CSIKÓS, H. KALÁSZ. 1998. Fluoride Intake, Distribution, and Bone Content in Diabetic Rats Consuming Fluoridated Drinking Water. *Fluoride.* 31: 33-42.

- BURNE, M., S. PANAGIOTOPOULOS, G. JERUMS, W. COMPER. 1998. Alterations in Renal Degradation of Albumin in Early Experimental Diabetes in the Rat: a New Factor in the Mechanism of Albuminuria. *Clin. Sci.* 95: 67-72.
- CAMPOS, J. 1998. Productos forestales no madereros en Chile. Corporación de Investigación Tecnológica, INTEC – CHILE, Santiago. Chile.
- COLE, T., S. KLOTZSCH, J. McNAMARA. 1997. Measurement of Triglyceride Concentration en Handbook of Lipoprotein Testing. AACC Press, Washington. USA.
- CONTRERAS, C. 1994. Diabetes Mellitus. Mediterráneo, Santiago. Chile.
- DAVIES, M. 2000. Sistema urinario en Manual de patología clínica en pequeños animales. Harcourt, Madrid. España.
- DAVIS, S., D. GRANNER. 2003. Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino en Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed., McGraw-Hill Interamericana, México. México.
- DEGENHARDT, T., N. ALDERSON, D. ARRINGTON, R. BEATTIE, J. BASGEN, M. STEFFES, S. THORPE, J. BAYNES. 2002. Pyridoxamine Inhibits Early Renal Disease and Dyslipidemia in the Streptozotocin-Diabetic Rat. *Kidney Int.* 61: 939-950.
- DE LA CALLE, H. 2001. Fármacos orales para el tratamiento de la diabetes en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- DURRUTY, P. 1992. El laboratorio en la diabetes mellitus en Diabetes Mellitus. Editorial Arancibia Hermanos, Santiago. Chile.
- DURRUTY, P., M. GARCÍA. 1992. Bases Bioquímicas y Fisiopatológicas de la Diabetes mellitus en Diabetes Mellitus. 2ª ed., Arancibia Hermanos, Santiago. Chile.
- ESMATJES, E. 2001. Nefropatía Diabética en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- ETTINGER, S., E. FELDMAN. 1997. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 4ª ed., Intermédica, Buenos Aires. Argentina.
- EVANS, W. 1996. Commerce and Production: Principles Related to the Commercial Production, Quality and Standardization of Natural Products en Pharmacognosy. 14º ed., Saunders. London. England.
- FIGUEROLA, D. 1997. Diabetes. 3ª ed., MASSON, Barcelona. España.

- FINCO, D. 1997. Kidney Function en Clinical Biochemistry of domestic animals. 5ª ed., Academic Press, San Diego. USA.
- FISCHER, J., C. TSCHOPE, A. REINECKE, C. GIACHELLI, T. UNGER. 1998. Upregulation of Osteopontin Expression in Renal Cortex of Streptozotocin Induced Diabetic Rats in Mediated by Bradykinin. *Diabetes*. 47: 1512-1518.
- FOSTER, D. 1998. Diabetes Mellitus en Harrison, Principios de Medicina Interna. 14ª ed, McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.
- FREIJANES, J., J. FLÓREZ. 1997. Insulina e hipoglicemiantes orales en Farmacología humana. 3ª ed., MASSON, Barcelona. España.
- GRECO, D., G. STABENFELDT. 1999. Endocrinología en Fisiología Veterinaria. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana, México. México.
- GROVER, J., S. YADAV, V. VATS. 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J. Ethnopharmacol*. 81: 81-100.
- GROVER, J., S. YADAV, V. VATS. 2003. Effect of Feeding *Murraya koeingii* and *Brassica juncea* Diet on (Correction) Kidney Functions and Glucose Levels in Streptozotocin Diabetic Mice. *J. Ethnopharmacol*. 85: 1-5.
- GRUPO DE ESTUDIO DE LA DIABETES EN LA ATENCIÓN PRIMARIA DE SALUD (GEDAPS). 2000. Guía para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en la atención primaria. 3ª ed., Harcourt, Madrid. España.
- GUYTON, A., J. HALL. 1997. Tratado de Fisiología Médica. 9ª ed., Editorial Interamericana, México. México.
- GUYTON, A., J. HALL. 1998. Fisiología y Fisiopatología. 6ª ed., Editorial Interamericana, México. México.
- HERRERA, J. 2001. Diabetes Mellitus en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- HOFFMANN, A. 1998. El árbol urbano en Chile. 3ª ed., Fundación Claudio Gay, Santiago. Chile.
- HOFFMANN, A., C. FARGA, J. LASTRA, E. VEGHAZI. 1992. Plantas Medicinales de uso Común en Chile. 2ª ed., Fundación Claudio Gay, Santiago. Chile.
- HOWANITZ, P., J. HOWANITZ, J. HENRY. 1993. Hidratos de carbono en Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed., Masson, S.A, Barcelona. España.

- JARA, A., G. GONZÁLEZ, D. BLUMENKRON. 2001. Clínica general de la diabetes mellitus en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- JYOTHIRMAYI, G.N., R. MODAK, A.S. REDDI. 2001. L-Lysine Reduces Nonenzymatic Glycation of Glomerular Basement Membrane Collagen and Albuminuria in Diabetic Rats. *Nephron*. 87: 148-154.
- KAMALAKKANAN, N., M. RAJADURAI, P. PRINCE. 2003. Effect of *Aegle marmelos* fruits on Normal and Streptozotocin-Diabetic Wistar Rats. *J. Med. Food*. 6: 93-98.
- KANEKO, J. 1997. Carbohydrate Metabolism and Its Diseases en Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5ª ed., Academic Press, San Diego. USA.
- KARAM, J. 1999. Hormonas pancreáticas y antidiabéticos en Farmacología básica y clínica. 7ª ed., El Manual Moderno, México. México.
- KĘDZIORA-KORNATOWSKA, K., S. SZRAM, T. KORNATOWSKI, L. SZADUJKIS-SZADURSKI, J., KĘDZIORA, G. BARTOSZ. 2003. Effect of Vitamin E and Vitamin C Supplementation on Antioxidative State and Renal Glomerular Basement Membrane Thickness in Diabetic Kidney. *Nephron Exp. Nephrol*. 95: 134-143.
- KONRAD, R., I. MIKOLAENKO, J. TOLAR, K. LIU, J. KUDLOW. 2001. The potential mechanism of the action of streptozotocin: inhibition of pancreatic  $\beta$ -cell O-GlcNac-selective N-acetyl-B-D-glucosaminidase. *Biochem. J*. 356: 31-41.
- KRAFT, H., D. SCHILLINGER. 1999. Análisis químico-clínico de la sangre en Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Acribia, S.A., Zaragoza. España.
- KUSUNOKI, J., K. ARAGANE, T. KITAMINE, H. KOZONO, K. KANO, K. FUJINAMI, K. KOJIMA, T. CHIWATA, Y. SEKINE. 2000. Postprandial Hyperlipidemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Is Due to Abnormal Increase in Intestinal Acyl Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase Activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 20: 171-178.
- LEE, Y.G., S.D. KIM. 2000. Effect of Palmiwon on Diabetes-prone BB Rats. *Food Sci. Biotechnol*. 9: 157-162.
- LEMUS, I., R. GARCÍA, E. DELVILLAR, G. KNOP. 1999. Hypoglycaemic Activity of Four Plants Used in Chilean Popular Medicine. *Phytother. Res*. 13: 91-94.
- LOBÓN, J., F. ESCOBAR. 2001. Macroangiopatía y diabetes en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.

- LUIZE, K., V. CECHINEL. 2002. Plantas do genero *Bauhinia*: Composicao química e potencial farmacológico. *Quim. Nova.* 25: 449-454.
- McPHEE, S., W. GANONG, V. LINGAPPA, J. LANGE. 2000. Fisiopatología Médica: Una Introducción a la Medicina Clínica. 2ª ed., Editorial El Manual Moderno, México. México.
- McPHERSON, R. 1993. Proteínas específicas en Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. 9ª ed., Masson, Barcelona. España.
- MAIZ, A. 1992. Objetivos y Elementos para el Control de la Diabetes Mellitus. *Boletín Esc. de Medicina de P. Universidad Católica de Chile.* 21: 11-13.
- MANZANO, P., A. SIMAL, F. BOTELLA. 2001. Nutrición en la diabetes mellitus en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- MARAÑÉS, J.P., M.E. MUNGUIRA, A. DURÁN. 2001. Diabetes y ejercicio físico en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- MERIC, S. 1997. Poliuria y polidipsia en Tratado de medicina interna veterinaria. 4ª ed., Intermédica, Buenos Aires. Argentina.
- MORALES, J. 1992. Nefropatía Diabética en Diabetes Mellitus. 2ª ed., Arancibia Hermanos, Santiago. Chile.
- MUÑOZ, O., M. MONTES, T. WILKOMIRSKY. 2001. Plantas Medicinales de Uso en Chile: Química y Farmacología. Editorial Universitaria, Santiago. Chile.
- MURALI, B., R.K. GOYAL. 2001. Effect of Chronic Treatment with Losartan on Streptozotocin Induced Diabetic Nephropathy. *Clin. Exp. Hypertens.* 23: 513-520.
- NACHAR, E. 1994. Evaluación del efecto hipoglicemiante de plantas medicinales en ratas con diabetes experimental. Tesis Química y Farmacia, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Santiago. Chile.
- NODA, M., T. MATSUO, H. NAGANO-TSUGE, M. OHTA, M. SEKIGUCHI, Y. SHIBOUTA, T. NAKA, Y. IMURA. 2001. Involvement of Angiotensin II in Progression of Renal Injury in Rats With Genetic Non-insulin-Dependent Diabetes Mellitus (Wistar Fatty Rats). *Jpn. J. Pharmacol.* 85: 416-422.
- PEPATO, M.T., A. BAVIERA, R. VENDRAMINI, M. MARQUES DA SILVA, I. KETTELHUT, I. BRUNETTI. 2003. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 15-20.
- PIZZORNO, J., M. MURRAY. 1995. Diabetes mellitus. *Diab. Me.* 6: 1-19.

- RADDATZ, V., G. LÓPEZ, P. DURRUTY, M. GARCÍA. 1998. Nueva clasificación y criterios diagnósticos de la diabetes mellitus. *Boletín del hospital San Juan de Dios*. 45: 145-155.
- REDDI, A., R. CAMERINI-DAVALOS. 1990. Diabetic Nephropathy: An Update. *Arch. Intern. Med.* 150: 31-43.
- RIFAI, N., P. BACHORIK, J. ALBERS. 1999. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins en Clinical Chemistry. 3ª edición. Saunders. Philadelphia.
- ROSNER, B. 2000. Fundamentals of Biostatistics. 5ª ed., Duxbury, New York. USA.
- SÁNCHEZ, P. 2001. Diagnóstico de la diabetes mellitus en Endocrinología. Editorial Médica Panamericana, Madrid. España.
- SASO, L., P. TOMMASINO, G. ITALIANO, E. GRIPPA, M.G. LEONE, M.T. GATTO, B. SILVESTRINI. 2000. Changes of Acute-Phase Proteins in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Physiol. Res.* 49: 403-409.
- SCHUMANN, B., S. SCHWEITZER. 1993. Estudio de la orina en Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed., Masson, S.A, Barcelona. España.
- SEGAL, P., P. BACHORIK, B. RIFKIND, R. LEVY. 1991. Lípidos y dislipoproteinemia en Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 8ª ed., SALVAT, Barcelona. España.
- SHENOY, A., R. GOYAL. 2002. Improvement of Insulin Sensitivity by Perindopril in Spontaneously Hypertensive and Streptozotocin-Diabetic Rats. *Indian J. Pharm.* 34: 156-164.
- SOARES, J.C., S. TEIXEIRA, M. CECIM. 2000. Glucose and Cholesterol Plasma Levels in Rats with Alloxan-Induced Diabetes mellitus Treated with Infusion of *Bauhinia candicans* or *Syzygium jambolanum*. *Cienc. Rural.* 30: 113-118.
- SPIEGEL, M. 1991. Estadística. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.
- SZKUDELSKI, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in  $\beta$  cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.
- THIBAUT, C., M.C. LAURY, D. BAILBE, A. KTORZA, B. PORTHA. 1992. Effect of prolonged in vivo glucose infusion on insulin secretion in rats with previous glucose intolerance. *Endocrinology.* 130: 2521-2527.
- TIETZ, N. W. 1995. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3ª ed., W.B. Saunders, Philadelphia. USA.

- TSAO, P., J. NIEBAUER, R. BUITRAGO, P. LIN, B. WANG, J. COOKE, Y. CHEN, G. REAVEN. 1998. Interaction of Diabetes and Hypertension on Determinants of Endothelial Adhesiveness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 947-953.
- TSCHOPE, C., A. REINECKE, U. SEIDL, M. YU, V. GAVRILUK, U. RIESTER, P. GOHLKE, K. GRAF, M. BADER, U. HILGENFELDT, J.B. PESQUERO, E. RITZ, T. UNGER. 1999. Functional, biochemical, and molecular investigations of renal kallikrein-kinin system in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 277: 2333-2340.
- UGOCHUKWU, N.H., N. E. BABADY, M. COBOURNE, S.R. GASSET. 2003. The effect of *Gongronema latifolium* extracts on serum lipid profile and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *J. Biosci.* 28: 1-5.
- UMRANI, D. N., R. K. GOYAL. 2002. Beneficial Effects of Fenoldopam Treatment on Renal Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 24: 207-219.
- VALDIVIESO, A. 1992. Nefropatía Diabética. *Boletín Esc. de Medicina de P. Universidad Católica de Chile.* 21: 42-44.
- VELÁSQUEZ, J. 2001. Utilización de Plantas Medicinales por Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 como Parte de su Tratamiento. Consultorio Gil de Castro, 2001. Tesis Enfermería, Universidad Austral de Chile, Facultad de Medicina, Valdivia, Chile.
- VERLANDER, J.W. 1999. Fisiología Renal en Fisiología Veterinaria. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana, México. México.
- WASAN, K. M., W. WONG, B. RODRIGUES. 1998. Streptozotocin –and Alloxan- Induced Diabetes Modifies Total Plasma and Lipoprotein Lipid Concentration and Composition without Altering Cholesteryl Ester Transfer Activity. *Pharmacol. Toxicol.* 83: 169-175.
- WATCHO, P., P. KAMTCHOUING, S.D. SOKENG, P.F. MOUNDIPA, J. TANTCHOU, J.L. ESSAME, N. KOUETA. 2004. Androgenic effect of *Mondia whitei* roots in male rats. *Asian J. Androl.* 6: 269-272.
- WEST, E., O. SIMON, E. MORRISON. 1996. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med. J.* 45: 60-62.
- WOO, J., D. CANNON. 1993. Intermediarios metabólicos e iones inorgánicos en Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed., Masson, S.A, Barcelona. España.
- YOKOZAWA, T., H. Y. KIM, E. J. CHO. 2002. Erythritol Attenuates the Diabetic Oxidative Stress through Modulating Glucose Metabolism and Lipid Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5485-5489.



ZANOELLO, A., C. MELAZZO, J. KERPEL. 2002. Efeito protector do *Syzygium cumini* contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. *Acta Farm. Bonaerense*. 21: 31-36.

ZAR, H. 1999. Bioestatistical analysis. 4<sup>a</sup> ed., Editorial Plentice-Hall International Inc, New Yersey. USA.

ZHANG, F., C. YE, G. LI, W. DING, W. ZHOU, H. ZHU, G. CHEN, T. LUO, M. GUANG, Y. LIU, D. ZHANG, S. ZHENG, J. YANG, Y. GU, X. XIE, M. LUO. 2003. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp. Anim.* 52: 401-407.

## 9. ANEXOS

### ANEXO 1: *Bauhinia candicans*.



<http://micol.fcien.edu.uy/flora/Bahunia-forficata.html>

**ANEXO 2:** Procedimiento operativo standard de elaboración del extracto fluido de *Bauhinia candicans* (\*).

- A. Se pesan la Pata de Vaca hierba seca, se colocan dentro del percolador y se añade la mezcla hidroalcohólica a utilizar, preparada al mezclar la siguiente proporción de solventes:
- Alcohol etílico potable 96%.
  - Agua desmineralizada.
- B. Deje reposar hasta completa humidificación de la hierba por 5 días.
- C. Abra el paso de la llave de goteo a una velocidad de 20 gotas/min.
- D. Recoja en un recipiente de acero inoxidable 90% de percolado. Almacene el líquido obtenido en un recipiente tapado hasta la etapa de mezclado.
- E. Continúe percolando hasta que el solvente de extracción permanezca incoloro.
- F. Evapore el líquido obtenido en el punto (E) en el destilador eléctrico hasta obtener un peso residual de percolado de 10%. El solvente evaporado es recogido en un recipiente de acero inoxidable para ser redestilado.
- G. Mezcle lo obtenido en el punto (D) y (F) para obtener PATA DE VACA EXTRACTO FLUIDO.
- H. Filtre por paño grueso y retire una muestra de 100 ml para Control de Calidad.
- I. Almacene en un recipiente de acero inoxidable hasta realizar los ajustes que sean necesarios y se entregue el visto bueno de Control de Calidad.

(\*): Derechos reservados Laboratorio de Homeopatía Alemana KNOP LTDA.

**ANEXO 3:** Valores de colesterol del grupo diabético sin tratamiento (grupo 2), obtenidos el día 20 del estudio.

| <b>N° RATA</b>        | <b>mg/dl</b> |
|-----------------------|--------------|
| 1                     | 51           |
| 2                     | 66           |
| 3                     | 68           |
| 4                     | 72           |
| 5                     | 43           |
| <b>Promedio</b>       | 60           |
| <b>Error estándar</b> | 5,5          |

## AGRADECIMIENTOS

- A Cristóbal Cerda, sobre todo por la comprensión y paciencia que tuvo al esperarme todo este tiempo.
- A mis hermanos Carla y Santiago por acogerme incondicionalmente y apoyarme siempre.
- A mis queridos amigos que más de alguna vez tuvieron que ayudarme con mis ratas (Nº4): Alejandra, Daniela, Marcelo, Stephanie, Claudia y María Ghislaine, gracias por todo su apoyo.
- A mi profesor patrocinante Dra. Viviana Bustos, por su paciencia, perseverancia y dedicación.
- Al Dr. Marcos Moreira por su apoyo, consejos, tiempo y excelente disposición.
- A mi profesor copatrocinante Dra. Carolina Gallardo, por su constante ayuda e interés en la realización de este trabajo.
- Al Dr. Leopoldo Ardiles, profesor colaborador, por su orientación en el desarrollo de esta investigación.
- Dr. Luis Améstica, por su valiosa orientación en el análisis estadístico.
- A los profesores del Instituto de Farmacología, en especial al Dr. Elías Caballero, Dr. Rafael Burgos y Dr. Frédérick Ahumada, por su colaboración en el desarrollo de este estudio.
- A los integrantes del Instituto de farmacología quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, en especial Srta. Juana Vargas, Sra. Nury Sánchez y al Sr. Darío Salazar quien con su excelente disposición y sabios consejos en manejo de animales de experimentación, fue clave en la realización de la parte práctica de este trabajo.
- A todas las personas que de una u otra forma han contribuido al logro de esta investigación: Dra. Sara Rodríguez, Sra. Helga Böhmwald, Sra. Graciela Valderrama y muy especialmente a la Sra. Anitsi Loaiza, Dra. Rousell Guiness y Dr. Felipe Gottschalk.
- Laboratorio Knop por su aporte económico, el que fue fundamental en la realización de esta investigación.