

Actividad hipoglucemiante de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* “yacón” y *Vitis vinifera* “uva” en ratas con diabetes inducida por aloxano

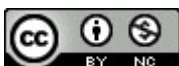
Hypoglycemic activity of the extracts of *Smallanthus sonchifolius* “yacon” and *Vitis vinifera* “grape” in rats with diabetes induced by alloxan

Héctor Vilchez C., Mario Pineda P. & Laura Villanueva B.

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima, PERÚ

Víctor Pulido C.

Instituto de Investigación, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima, PERÚ



Recibido: 10-III-2018; aceptado: 20-IV-2018; publicado online: 30 -VII-2018; publicado impreso: 30-VIII-2018

Resumen

En el presente estudio se evaluó en qué medida el extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* "yacón" y el extracto acuoso de las semillas de *Vitis vinifera* "uva" son seguras y eficaces en el efecto sinérgico frente a la actividad hipoglucemiante en ratas con inducción experimental de diabetes mellitus tipo 2. La seguridad en animales vía oral se realizó a dosis única en *Rattus norvegicus albinus* machos de la cepa Holtzman y a dosis repetidas durante 28 días en *Rattus norvegicus albinus* machos y hembras de la misma cepa. La inducción de diabetes mellitus tipo 2 a *Rattus norvegicus albinus* se realizó con el aloxano monohidratado (Sigma, Saint Louis, MO, EE. UU.) a dosis única de 100 mg/kg de peso. Los resultados indicaron una dosis letal 50 (DL50) por encima de los 2000 mg/kg para ambos extractos, por lo que son sustancias no tóxicas y, en el ensayo de toxicidad a dosis repetidas, se halló ligero incremento de alanina aminotransferasa; no se encontraron lesiones microscópicas ni macroscópicas relacionadas con los tratamientos. En el ensayo sobre la diabetes mellitus tipo 2, los grupos de glibenclamida, *Smallanthus sonchifolius* "yacón", *Vitis vinifera* "uva" y la sinergia de *Smallanthus sonchifolius* + *Vitis vinifera* disminuyeron la glucemia, siendo significativo comparado con el grupo control positivo SSF ($p < 0.05$). La sinergia de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* + *Vitis vinifera* representa mayor disminución de la glucemia ($p < 0.05$). El posible mecanismo de acción de la sinergia de los extractos es que mejoraría la secreción de insulina por el páncreas. En las condiciones experimentales, la sinergia del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* "yacón" y el extracto acuoso de las semillas de *Vitis vinifera* "uva" ha evidenciado ser segura y tener efecto hipoglucemiante en *Rattus norvegicus albinus* diabéticas inducidas por aloxano.

Palabras clave: *Smallanthus sonchifolius* "yacón", *Vitis vinifera* "uva", diabetes mellitus, aloxano.

Abstract

In the present study, it was evaluated to what extent the hydroalcoholic extract of the leaves of *Smallanthus sonchifolius* "yacon" and the aqueous extract of the seeds of *Vitis vinifera* "grape" are safe and effective in the synergetic effect against hypoglycemic activity in rats with experimental induction of diabetes mellitus type 2. Safety in animals orally was performed at a single dose in *Rattus norvegicus albinus* males of the Holtzman strain and at repeated doses for 28 days in *Rattus norvegicus albinus* males and females of the same strain. The induction of diabetes mellitus type 2 to *Rattus norvegicus albinus* was performed with the alloxan monohydrate (Sigma, Saint Louis, MO, USA) at a single dose of 100 mg/kg of weight. The results indicated a lethal dose 50 (LD50) above 2000 mg/kg for both extracts, so they are non-toxic substances and, in the repeated dose toxicity test, there was a slight increase in alanine aminotransferase; no microscopic or macroscopic lesions were found related to the treatments. In the test of diabetes mellitus type 2, the groups of glibenclamide, *Smallanthus sonchifolius* "yacon", *Vitis vinifera* "grape" and synergy of *Smallanthus sonchifolius* + *Vitis vinifera* decreased blood glucose, which is significant compared to the SSF positive control group ($p < 0.05$). The possible mechanism of action of the synergy of the extracts is that it would improve the secretion of insulin by the pancreas. In the experimental conditions, the synergy of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Smallanthus sonchifolius* "yacon" and the aqueous extract of the seeds of *Vitis vinifera* "grape" have shown to be safe and to have hypoglycemic effect in *Rattus norvegicus albinus* with diabetes induced by alloxan.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius* "yacon", *Vitis vinifera* "grape", diabetes mellitus, alloxan.

Citación: Vilchez, H.; M. Pineda; L. Villanueva & V. Pulido. 2018. Actividad hipoglucemiante de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* "yacón" y *Vitis vinifera* "uva" en ratas con diabetes inducida por aloxano. *Arnaldoa* 25(2): 539-564. doi: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25213>

Introducción

La diabetes es una enfermedad considerada como una de las principales causas del deterioro agresivo de la salud de un individuo, este desorden metabólico afecta actualmente a más de 143 millones de personas en el mundo y según las estimativas de la Organización Mundial de la Salud (WHO) en el 2030 aproximadamente 300 millones de personas estarán afectadas por esta enfermedad (Boyle *et al.*, 2001; Tiwari & Rao, 2002). Según datos puntualizados por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) 2,9% de los peruanos presentan esta enfermedad y la mayoría están concentrados en Lima (2015). La *Diabetes mellitus* tipo 2 se caracteriza por la elevación de la glucosa en la sangre (hiperglucemia), puede ocurrir debido a defectos en la secreción o en la acción de la hormona insulina, que es producido en el páncreas por las células beta pancreática (O'Brien & Granner, 1996). La función principal de la insulina, es de promover el ingreso de glucosa a las células del organismo de forma que ella pueda ser aprovechada para las diversas actividades celulares (Villavicencio, 1995). Entre la sintomatología de esta enfermedad tenemos invalidez física, así como complicaciones multiorgánicas que traen como consecuencia un incremento a la morbilidad y la mortalidad, independientemente de las circunstancias sociales, culturales y económicas (Mcphee & Ganong, 2000).

Durante los últimos años se han desarrollado nuevas moléculas farmacológicas para el tratamiento de los pacientes con *Diabetes mellitus* tipo 2 y, en la actualidad, se dispone de un número creciente de herramientas terapéuticas que permiten alcanzar el control glucémico deseable en la gran mayoría de ellos,

aunque solo de forma transitoria en muchos, debido a la progresión de esta compleja enfermedad (Day & Bailey, 1988; UICN *et al.*, 1993). Unido a lo anterior, con frecuencia el tratamiento medicamentoso disponible está asociado a efectos indeseados, como el incremento de peso corporal, la aparición de hipoglucemias o la retención de líquidos, que pueden incrementar el riesgo cardiovascular en dichos afectados y limitan su optimización (Villavicencio, 1995). En el variado arsenal terapéutico para la *Diabetes mellitus* tipo 2, se encuentran las plantas medicinales que han sido utilizadas para el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad, solo o en combinación de ellos o con otros antidiabéticos orales, sin embargo, se necesita realizar ensayos pre clínicos y clínicos que intenten demostrar si este grupo de alternativa terapéutica pudiera tener cierta eficacia en el tratamiento de la *Diabetes mellitus* tipo 2. (Masson, *et. al.*, 2003; Sato, 2006).

Las plantas medicinales con actividad antidiabética, pueden constituir una fuente importante de nuevos compuestos orales hipoglucemiantes, ya sea como compuestos de primera línea, en el tratamiento de la diabetes, o como coadyuvantes de las terapias existentes (Dávis & Granner, 2003; Rodriguez, 2003). Estas bases teóricas fueron complementadas por otras experiencias que han permitido orientar la propuestas de buscar nuevas alternativas de tratamiento mediante el uso sinérgico de productos naturales como es nuestro caso el *Smalanthus sonchifolius* "YACON" y *Vitis vinifera* "UVA". La asociación conocida del estrés oxidativo a enfermedades metabólicas como *Diabetes mellitus* tipo 2, degenerativas, como el cáncer y otras como las enfermedades cardiovasculares (Baynes & Thrope, 1999), estimulan la investigación

de compuestos, fármacos y alimentos con capacidad antioxidante, a partir de diversos productos naturales, tales como la uva y sus derivados.

Para determinar el efecto hipoglucemiante se diseñó una metodología de estudio pre clínico *in vivo*, empleando técnicas sustentadas previamente en investigaciones nacionales e internacionales, garantizando de esa forma la confiabilidad de los datos obtenidos (González, 2006; Tasayco, 2007). Se realizó un estudio longitudinal, experimental del tipo "casos y controles", estuvo orientada a evaluar la seguridad y efecto sinérgico de la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* "YACON" y del extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinifera* "UVA" en "ratas" que fueron previamente inducidas experimentalmente a *Diabetes mellitus* tipo 2.

Material y métodos

Preparación de los Extractos

La planta denominada "YACON" procedente de la Finca Santa Rosa ubicado en Car. El Oconal Km 3. distrito de Villa Rica, provincia de Oxapampa en la región Pasco, fue identificada en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el nombre científico de *Smallanthus sonchifolius*. Las hojas fueron cosechadas a los 4 meses de siembra, los cuales fueron lavadas, limpiadas y cortadas en fragmentos pequeños, luego fueron secadas a una temperatura de 40 °C por 120 h y micro pulverizadas. Luego se procedió a pesar 100g y se maceró en 1000 mL de alcohol 75% por 7 días, teniendo en cuenta agitación cada 12 horas, después se filtró y se colocó en una estufa a 39±2°C hasta

eliminación del solvente y obtención de peso seco, después de pesar se almacenó en un envase de vidrio color ámbar con tapa hermética y se colocó a refrigeración (04±2°C) hasta su posterior uso.

Las semillas de *Vitis vinifera* "UVA" procedente de vinificaciones realizadas en los Viñedos Terry ubicado en el lateral 14 del distrito de Grocio Prado, provincia de Chincha, departamento de Ica, se obtuvieron al momento de realizar el descube de elaboración del vino, por lo tanto fueron sometidas a los procesos de maceración y fermentación alcohólica, en forma previa a su utilización. Las semillas fueron lavadas y limpiadas, luego fueron secadas a una temperatura de 40°C por 180 horas. Luego se procedió a molienda, luego se pesaron 100 g y se disolvió en 1000 mL de agua destilada a 90°C, el tiempo de tratamiento fue de 6 horas, luego se filtró y se colocó en una estufa a 39±2°C para obtener al final un extracto seco. Luego se almacenó en un envase de vidrio color ámbar con tapa hermética y se colocó a refrigeración (04±2°C) hasta su posterior uso. La preparación de ambos extractos, se desarrolló en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

Estudio Fitoquímico

La identificación de metabolitos secundarios se realizó a través de pruebas químicas de caracterización (Reacción de Molish, Reacción de Antrona, Reacción de la Ninhidrina, Reacción de Dragendorf, Reacción de Shinoda, Prueba de la Espuma, Reacción del Tricloruro Férrico, Reacción de la Gelatina, Reacción de Lieberman-Burchard, Reacción de Bornträger, Reacción de Sonnenschein y Reacción de Mayer), según (Dominguez, 1973; Ganoza, 2001).

Modelo Experimental

Se trabajó con "ratas albinas" de la cepa Holtzman, machos y hembras sanas, procedentes del Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú). Las "ratas" se instalaron en el Mini Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega (Lima-Perú), donde fueron aclimatadas durante 07 días a una temperatura entre 25-28 °C, con una humedad entre 60-70% y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, se les mantuvo con libre acceso al agua y alimentos balanceados de la marca "La Molina". Después de la aclimatación, las "ratas" entre las 08 y 12 semanas de edad alcanzaron un peso > 200 g (criterio de inclusión para el estudio) y se utilizaron 72 ratas para tomar una muestra de sangre, previo ayuno de 12 h, para determinar las glicemias y verificar si son normales comparándolas con el rango de valores de normalidad según la base de datos de glicemias para "ratas albinas" machos y hembras sanas aclimatadas en el Mini Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. (Glicemia en ayunas: 89-105 mg/dL) (González, 2006; Tasyco, 2007).

A las "ratas" cuyas glicemias estuvieron dentro del rango de normalidad, se les indujo la diabetes experimental (Hiperglicemia) mediante la administración vía intraperitoneal de aloxano monohidratado (Sigma, Saint Louis, MO, USA) diluido en agua destilada (5%) a una dosis de 100 mg/kg, este modelo experimental fue adaptado de estudios previos (Nimenibo-Uadia, 2003; Castañeda, et. al., 2008), luego de esta administración se esperó 48 h, momento en el cual se les tomó una prueba basal de glicemia, previo ayuno de 12 h, para evaluar si el nivel de glicemia se encontraba por encima de 200 mg/dL (criterio de

inclusión que asumimos para considerar diabetes experimental) y todas las "ratas" que presentaron estos valores fueron incluidas en el estudio para administrarles las sustancias por experimentar. De las ratas evaluadas solo 60 completaron el experimento.

Grupos Experimentales

Las 60 "ratas" que cumplieron los criterios de inclusión fueron distribuidas aleatoriamente en seis grupos de diez "ratas". Todas las sustancias administradas fueron por vía oral mediante cánula intragástrica. Los grupos fueron: Grupo I: Normal + 2 mL de Suero Fisiológico; Grupo II: Control (+) + 2 mL de Suero Fisiológico; Grupo III: Glibenclamida 10 mg/kg; Grupo IV: *Smallanthus sonchifolius* "YACON" 500 mg/kg; Grupo V: *Vitis vinifera* "UVA" 500 mg/kg; Grupo VI: *Smallanthus sonchifolius* "YACON" 500 mg/kg + *Vitis vinifera* "UVA" 500 mg/kg

Medición de la Actividad Hipoglucemiante

Para determinar los niveles de glucosa en las "ratas" fueron determinados utilizando un kit comercial, el Glucómetro Accu-Chek Active de laboratorios Roche. Las muestras de sangre se recolectan por punción en el apice de las colas, desechando la primera gota y recibiendo la siguiente sobre la tira reactiva. Los valores obtenidos del Glucómetro fueron expresados en mg/dL. Se tomaron muestras de sangre por las mañanas 1 hora después de cada administración de los tratamientos durante 7 días consecutivos

Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como media aritmética ± error estándar, porcentajes, figuras, entre otros. Para el análisis estadístico de las variables cuantitativas

se empleó el análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa para la variable evaluada intergrupos e intragrupos, luego se realizó un análisis post hoc mediante el test de Scheffé. El nivel de significancia fijado es $P < 0.05$. Se usó el software estadístico SPSS for Windows versión 20.

Aspectos Éticos

Al realizar el presente estudio, se tuvo en cuenta las recomendaciones para el manejo de animales de experimentación según lo estipulado en la Directiva Europea 2010/63/EU para la protección de animales de laboratorio. Previo a realizar la eutanasia,

las “ratas” fueron sedadas con ketamina 5 mg/kg vía intramuscular y luego fueron sacrificadas por el método de dislocación cervical (The European Parliament and The Council of The European Union, 2010).

Resultados

En el estudio fitoquímico preliminar se determinó los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinifera* “UVA”, donde se puede apreciar la presencia de compuestos fenólicos, taninos, cumarinas y quinonas, así como la presencia de alcaloides y metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico del *Smallanthus sonchifolius* “YACON” (Tabla 1).

Tabla N° 1: Estudio Fitoquímico preliminar de los extractos de *Vitis Vinifera* y *Smallanthus sonchifolius*.

Metabolito Secundario	Reactivo utilizado	Extracto acuoso de semillas del <i>Vitis vinifera</i> (Uva) Positivo (+): Negativo (-)	Extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Smallanthus sonchifolius</i> (Yacón) Positivo (+): Negativo (-)
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+++	+
Taninos	Gelatina	+++	+
Flavonoides	Shinoda	++	++
Cumarinas	NaOH 10%	++	-
Quinonas	Bornträger	++	-
Alcaloides	Dragendorff	-	-
Alcaloides	Sonnenschein	+	-
Esteroides	Liebermann	-	++
Glucósidos	Antrona	-	+

En la evaluación de la toxicidad aguda oral, la sintomatología observada en mayor frecuencia en relación directa con la dosis fue sedación y disminución de la actividad motora, que en algunos casos desapareció en las primeras 24 horas luego de la

administración y en otros casos produjo la muerte del animal. (Tabla 2).

La variación del peso corporal durante 4 semanas de tratamiento no es significativa en el grupo control y tratado. (Tabla 3)

Tabla 2: Porcentaje de mortalidad obtenido con los tratamientos del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius*, y extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinifera* y la sinergia de hojas de ambos extractos.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Nº	Nº Muertos	Mortalidad (%)
Extracto hidroalcohólico de hojas de Yacón	2500	5	1	20
	5000	5	2	40
	10000	5	3	60
	15000	5	4	80
Extracto acuoso de semillas de Uva	2500	5	0	0
	5000	5	1	20
	10000	5	2	40
	15000	5	3	60
Extracto hidroalcohólico de hojas de Yacón + extracto acuoso de semillas de Uva	2500	5	1	20
	5000	5	1	40
	10000	5	3	60
	15000	5	4	80

Tabla 3: Variación en el peso corporal durante el ensayo con tratamiento diario de 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas *Smallanthus sonchifolius* y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera*.

Sexo	Semana	Peso corporal (g)	
		Grupo control	Grupo tratado
Machos	0	236 ± 9.9	258 ± 7.8
	1	240 ± 7.6	259 ± 8.3
	2	242 ± 8.0	260 ± 7.7
	3	244 ± 7.3	262 ± 8.7
	4	248 ± 7.1	263 ± 9.3
Hembras	0	222 ± 9.2	210 ± 8.2
	1	223 ± 7.0	211 ± 8.1
	2	225 ± 8.4	213 ± 8.2
	3	225 ± 6.3	213 ± 9.1
	4	226 ± 7.0	215 ± 9.0

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

Teniendo en cuenta la química sanguínea. Los valores para ambos sexos se encuentran dentro de lo normal, sólo el indicador Alaninoaminotransferasa

se encuentra ligeramente por encima de lo valores normales establecidos para la especie en estudio. (Tabla 4).

Tabla 4: Variaciones en los parámetros de química sanguínea después de 28 días de tratamiento diario con 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera*.

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Colesterol T (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Alanino aminotransferasa (U/L)
Machos	95.7-147.7	36.6-57.2	33.3-65.5	35.1-53.5
V.N.*				
Control	101.8 ± 9.8	60.4 ± 5.3	48.2 ± 11.6	57.6 ± 3.9
Tratado	96.0 ± 8.0	54.8 ± 2.6	52.0 ± 9.7	53.2 ± 12.1
Hembras	112.9-170.9	44.4-68.2	38.1-66.1	28.8-46.0
V.N.*				
Control	98.4 ± 9.3	51.60 ± 10.3	51.6 ± 10.3	45.0 ± 6.9
Tratado	115.20 ± 8.1	53.8 ± 12.6	60.8 ± 8.0	49.2 ± 8.0

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

V.N. = Valor normal.

*Fuente: González, et al., 2006. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas por 28 días, extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en "ratas" Cenp: SPRD. Rev Cubana Plant Med, Jun 2006, vol.11, no.2. ISSN 1028-4796

En la fórmula leucocitaria no se ha observado alteraciones, en los indicadores de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos se encuentra dentro de los valores normales. (Tabla 5).

Tabla N° 5: Variaciones en los parámetros hematológicos después de 28 días de tratamiento diario con 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera*.

Grupo	Leucocitos (x10 ³ /uL)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)
Machos	3.4-5.6	22.8-28.3	70.5-75.8	0-4	0-4	0-1
V.N.*						
Control	3.8 ± 0.5	23.4 ± 1.7	72.0 ± 2.7	1.8 ± 0.4	3.1 ± 0.3	0.9 ± 0.4
Tratado	3.8 ± 0.3	23.7 ± 1.6	69.7 ± 1.6	1.2 ± 0.7	3.7 ± 0.8	0.6 ± 0.3
Hembras	2.8-5.4	21.1-27.3	70.8-77.8	0-4	0-4	0-1
V.N.*						
Control	3.9 ± 0.3	23.8 ± 1.1	72.8 ± 2.9	1.6 ± 0.3	2.7 ± 1.0	0.7 ± 0.4
Tratado	4.0 ± 0.4	24.1 ± 1.9	73.3 ± 4.9	1.8 ± 0.4	3.1 ± 0.6	1.0 ± 0.5

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

V.N: Valor normal.

*Fuente: González, et al., 2006. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas por 28 días, extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en "ratas" Cenp: SPRD. Rev Cubana Plant Med, Jun 2006, vol.11, no.2. ISSN 1028-4796

Durante el período de estudio de toxicidad sub agudo durante 28 días no se produjo muerte de ningún animal, todos fueron sacrificados al finalizar la investigación. Al realizar la necropsia no se encontraron lesiones microscópicas

ni macroscópicas relacionadas a los tratamientos en estudio. Los valores de pesos relativos de los órganos no mostraron diferencias significativas respecto al control en ambos sexo.

Tabla N° 6: Variaciones de peso relativo de órganos después de 28 días de tratamiento diario con 500 mg/kg de Extracto hidroalcohólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* y 500 mg de extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera*.

Grupo	Corazón	Hígado	Páncreas	Riñones	Pulmón	Ovarios	Testículos
Machos							
Control	0.34 ± 0.05	2.00 ± 0.10	0.22 ± 0.04	0.54 ± 0.05	0.58 ± 0.08		0.48 ± 0.13
Tratado	0.30 ± 0.07	2.46 ± 0.24	0.24 ± 0.05	0.62 ± 0.08	0.54 ± 0.13		0.60 ± 0.16
Hembras							
Control	0.32 ± 0.04	2.08 ± 0.14	0.14 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.94 ± 0.20	
Tratado	0.26 ± 0.05	2.50 ± 0.54	0.30 ± 0.07	0.64 ± 0.05	0.50 ± 0.08	0.92 ± 0.28	

Los valores se expresan en media aritmética ± Error estándar

En la Tabla N° 7 se presentan los datos del estudio de efecto hipoglucemiante. En las concentraciones de glucosa basal existen diferencias significativas de los grupos diabéticos con respecto al control normal SSF (p<0.05). Las concentraciones de glucemia durante los siete días de tratamiento para el grupo control (-) + SSF existe ligera disminución pero no es significativa (p>0.05).

Los grupos de Glibenclamida®, *Smallanthus sonchifolius*, *Vitis vinifera*

y "YACON" + "UVA" disminuyen la glucemia durante los días de tratamiento, siendo significativo comparado con el grupo control positivo SSF (p<0.05). El grupo de "YACON"+"UVA" representa mayor disminución de la glucemia y es significativo comparado con el control positivo SSF.

El signo negativo del porcentaje de variabilidad (%V) indica disminución de la glicemia.

Tabla N° 7: Concentración media de glucosa (mg/dL) y error estándar en sangre de ratas con inducción de diabetes mellitus tipo 2 por aloxano

TRATAMIENTOS	MEDIAS DE GLUCOSA (mg/dL)														
	BASAL	1 DIA		2 DIA		3 DIA		4 DIA		5 DIA		6 DIA		7 DIA	
	Media±ES	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V	Media±ES	%V
Control (-) + SSF	99.10±9.53	99.30±9.73	5.85	96.70±10.47	-2.61	94.30±10.58	-0.31	90.80±8.28	-3.71	87.20±6.23	-3.96	86.60±5.68	-0.68	86.00±6.43	-0.69
Control (+) + SSF	260.30±23.93	245.40±16.08	-5.72	250.40±24.66	-2.03	245.80±24.29	-1.83	245.30±18.98	-0.20	240.10±16.01	-2.11	230.40±12.18	-4.03	220.30±8.73	-4.38
Glibendámiida 10 mg/kg	248.50±20.56	220.50±18.20	-11.26	200.30±23.83	-9.16	190.00±23.23	-5.14	170.00±21.55	-10.52	150.40±15.18	-11.52	120.50±9.20	-19.88	100.90±7.36	-16.26
Yacón 500 mg/kg	248.60±25.91	211.60±17.33	-14.88	189.70±16.50	-10.34	168.40±18.26	-11.22	138.70±14.43	-17.63	133.90±25.65	-3.46	109.10±15.09	-18.52	101.80±6.8	-6.69
Uva 500 mg/kg	232.10±16.5	204.80±19.32	-11.78	185.00±16.89	-9.66	169.90±18.18	-8.16	154.00±25.96	-9.35	129.80±22.05	-15.71	114.70±14.94	-11.63	103.60±6.80	-9.67
Yacón 500 mg/kg + Uva 500 mg/kg	264.40±29.61	184.80±13.23	-30.10	131.60±6.48	-28.78	125.10±6.39	-95.06	123.00±7.18	-1.67	116.70±27.91	-5.12	99.00±3.33	-15.16	85.50±6.19	-13.63
SSF: Solución Salina Fisiológica		ES: Error estándar		%V(Porcentaje de Variabilidad)= Glucosa N días * 100 / Glucosa basal										n: Representa el día de tratamiento	
p<0.05															

Para evaluar el efecto hipoglucemiante en animales diabéticos se procedió a inocular los extractos anteriormente caracterizados y seguidamente se midió la glucemia durante 7 días.

Previamente a los ensayos de la actividad hipoglucemiante *in vivo*, fue necesario obtener ratas que presenten la enfermedad de *Diabetes mellitus* tipo 2, para

este objetivo fue utilizado el medicamento Aloxano® en la concentración de 100 mg/kg, la (Fig. 1) muestra la efectiva inducción de la *Diabetes mellitus* en "ratas" saludables del género *Rattus norvegicus albinus*, después de los días de inoculación de la droga fue mostrado diferencia significativa al compararlo con el grupo control ("Ratas" saludables).

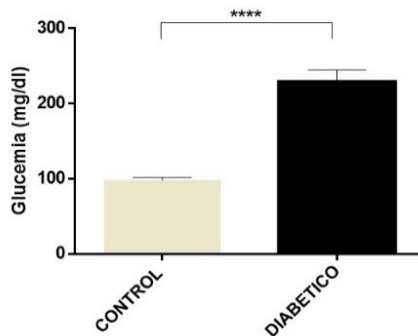


Fig. 1: *Rattus norvegicus albinus* inducidas con *Diabetes mellitus* tipo 2. Mediante la administración intra-peritoneal de Aloxano® (70 mg/kg) por un periodo de 48 horas en condiciones de laboratorio (DIABETICO) fueron inducidas 10 "ratas" (*Rattus norvegicus albinus*) a la enfermedad de *Diabetes mellitus* tipo 2. Como grupo control, fueron usados 10 animales inoculados con suero fisiológico (CONTROL). Parámetros de significancia; ****: p<0001.

Después de inducir al grupo de animales la *Diabetes mellitus* tipo 2, decidimos evaluar el tiempo que estos animales podían permanecer con esta enfermedad, debido a que se sabe que el Aloxano® provoca una inestabilidad homeostática alterando directamente a las células beta pancreáticas, originando de esta forma una alteración en

la síntesis de insulina en estos organismos; en este sentido, existe un tiempo en el cual estos animales consiguen recuperar la homeostasis. La eficiencia de la inducción de *Diabetes mellitus* en *Rattus norvegicus albinus* durante el periodo experimental en este trabajo, es mostrado en la Fig. 2 (A y B).

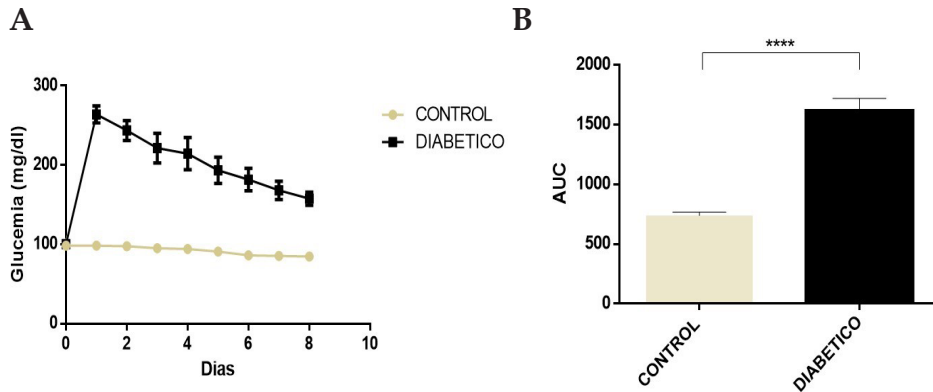


Fig. 2: Inducción de *Rattus norvegicus albinus* con *Diabetes mellitus* tipo 2 durante 7 días. (A) Fue evaluado la hiperglucemia del grupo de *Rattus norvegicus albinus* inducidas a *Diabetes mellitus* tipo 2 con Aloxano® (100 mg/kg) durante siete días y el grupo de *Rattus norvegicus albinus* saludables fueron usadas como CONTROL. (B) Se realizó un análisis del área bajo la curva (AUC) de los animales DIABETICOS y saludables (CONTROL). Parámetros de significancia; ****: $p < 0,001$.

Después de realizar la caracterización del modelo de estudio (*Rattus norvegicus albinus* diabéticos), el objetivo de este trabajo es medir la glucemia en estas animales frente al efecto sinérgico de *Smallanthus sonchifolius* y *Vitis vinifera*. En primer lugar nos propusimos a evaluar los extractos de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de las semillas de *Vitis vinifera* separadamente.

La Fig. 3A muestra los perfiles de las curvas glucémicas de los animales modelo diabéticas (*Rattus norvegicus albinus*), tratados con Glibenclamida® (medicamento que disminuye la glucemia en sangre) y

tratadas con extracto de hojas de *Smallanthus sonchifolius*, donde se puede observar que el extracto de *Smallanthus sonchifolius* presentó diferencias significativas en todos los puntos analizados al ser comparados con el grupo control (DIABETICO), también se observó diferencias significativas entre el grupo usado como control positivo para bajar la glicemia (GLIBENCLAMIDA®) y el grupo control diabético. Adicionalmente, estos datos fueron evaluados usando el área bajo la curva (AUC) de cada perfil glucémico, donde fue observado que tanto el grupo Glibenclamida® y el grupo tratado

con el extracto de hojas de *Smallanthus sonchifolius* mostraron diferencias significativas al ser comparados con el grupo control (DIABETICO), evidenciando

de esta manera el efecto del extracto de hojas de *Smallanthus sonchifolius* en las ratas diabéticas (Fig. 3B).

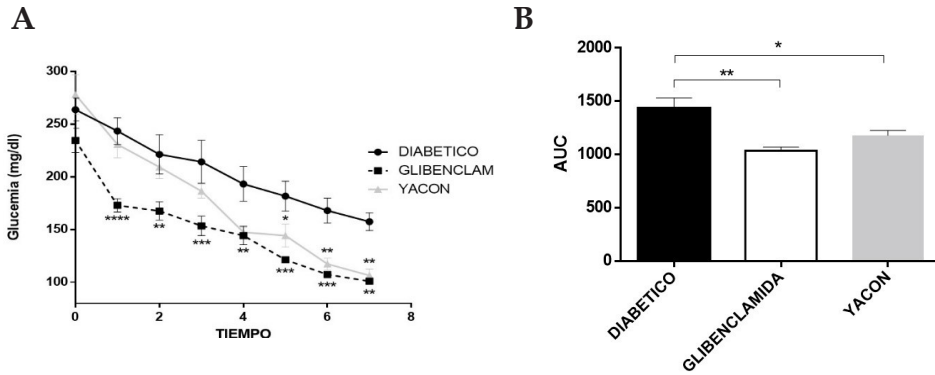


Fig. 3: Acción del extracto de *Smallanthus sonchifolius* sobre *Rattus norvegicus albinus* diabéticos. (A) Ensayos de los perfiles glucémicos de los grupos de los animales modelo; CONTROL (*Rattus norvegicus albinus* diabéticos), control positivo (GLIBENCLAMIDA®) y tratadas con extracto de hojas de *Smallanthus sonchifolius*.

Estos experimentos fueron desarrollados durante siete días en condiciones de laboratorio. (B) Los datos obtenidos en los tratamientos con los grupos DIABETICOS, animales tratados con GLIBENCLAMIDA® y saludables (CONTROL) fueron analizados utilizando el área bajo la curva (AUC). Parámetros de significancia; **: $p < 0,05$ y *: $p < 0,1$.

Seguidamente se evaluó la glucemia de *Rattus norvegicus albinus* diabéticos tratadas sobre la acción del extracto de semillas de *Vitis vinifera*, en la Fig. 4A se observa el grupo de animales diabéticos que fueron tratados con el medicamento GLIBENCLAMIDA®

mostrando una disminución significativa de la glicemia en varios puntos de la curva, igualmente los animales diabéticos tratadas con el extracto de semillas de *Vitis vinifera* mostraron considerablemente la caída significativa de la glicemia de estos animales al compararlos al grupo control (DIABETICO). Estos resultados también son observados al analizar los datos usando el área bajo la curva (AUC), confirmando de esta forma la eficacia que tiene el extracto de las semillas de *Vitis vinifera* de disminuir la glucemia en el grupo de *Rattus norvegicus albinus* diabéticos (Fig. 4B).

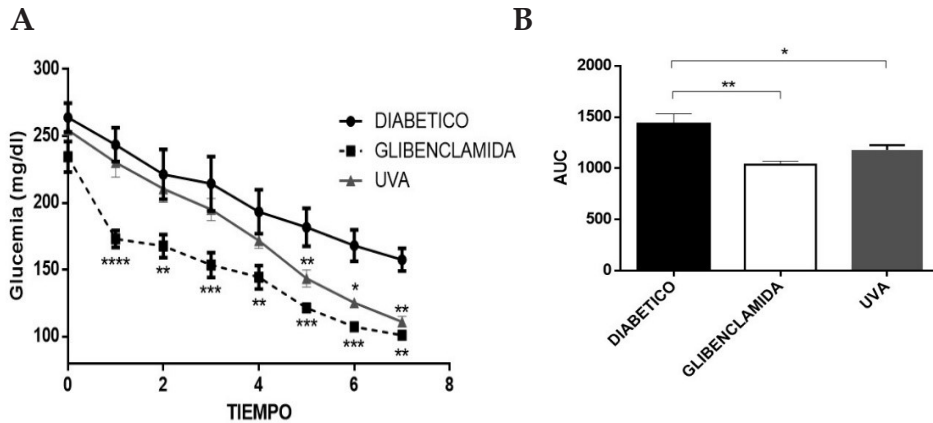


Fig. 4: Acción del extracto de *Vitis vinifera* sobre *Rattus norvegicus albinus* diabéticos. (A) Perfiles glucémicos de los grupos CONTROL (*Rattus norvegicus albinus* diabéticos), animales diabéticos tratados con GLIBENCLAMIDA® y animales diabéticos tratados con extracto de semillas de *Vitis vinifera* durante siete días de tratamiento. (B) Análisis de los datos obtenidos de *Rattus norvegicus albinus* diabéticos tratados con Aloxano®, Glibenclamida® y extractos de semillas de *Vitis vinifera* usando el área bajo la curva (AUC). Parámetros de significancia; ****. $p < 0,001$; ***. $p < 0,01$; **. $p < 0,05$; *. $p < 0,1$. Al ser confirmado que los extractos provenientes de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de las semillas de *Vitis vinifera* tienen la capacidad de disminuir significativamente la glicemia de *Rattus norvegicus albinus* diabéticos analizados independientemente, se procedió a investigar si, el sinergismo de estos dos extractos podría presentar la acción hipoglucemiante sobre *Rattus norvegicus albinus* diabéticos usados en este estudio.

Para llegar a este objetivo los animales diabéticos fueron tratados con el medicamento Glibenclamida® en la concentración de 70 mg/kg (GLIBENCLAMIDA®), otro grupo de animales diabéticos fueron tratados con la mezcla de los extractos de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y el extracto de las semillas de *Vitis vinifera* ("YACON"+"UVA") para ser comparadas con el grupo control (DIABETICO), fueron observadas diferencias significativas entre los perfiles glucémicos (Fig. 5A). Paralelamente los datos obtenidos en los análisis de la hipoglucemia fueron usados para evaluar el área bajo la curva (AUC) donde se evidencio en la Fig. 5B

que el extracto de las hojas *Smallanthus sonchifolius* y el extracto de semillas de *Vitis vinifera* ("YACON"+"UVA") presentó una gran diferencia significativa cuando fue comparado con el grupo control (DIABETICO).

Por los resultados arriba mostrados podemos afirmar que la mezcla de los extractos de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* más el extracto de semillas de *Vitis vinifera* presentaron una acción hipoglucemiante, al igual que el extracto de *Smallanthus sonchifolius* y el extracto de semillas de *Vitis vinifera* analizados independientemente.

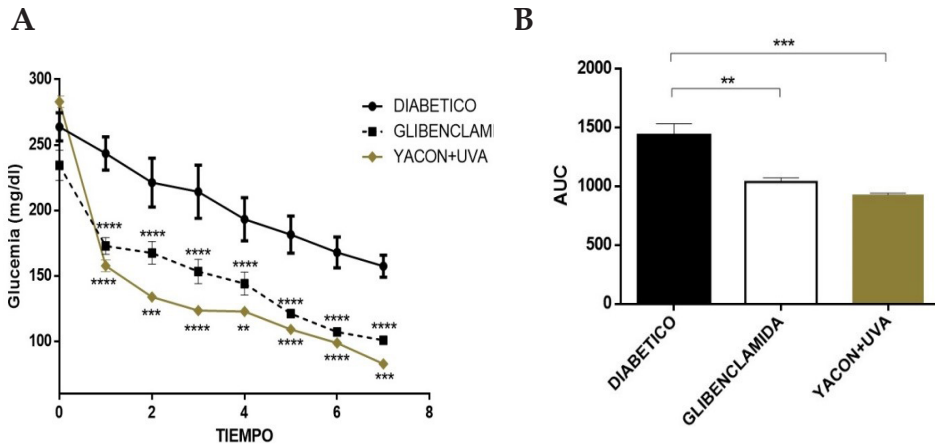


Fig. 5: Acción hipoglucemiante de la mezcla del extracto de *Smallanthus sonchifolius* y de *Vitis vinifera* sobre *Rattus norvegicus albinus* diabéticos. (A) Curvas glucémicas de los grupos CONTROL (*Rattus norvegicus albinus* diabéticos), animales diabéticos tratados con GLIBENCLAMIDA® y animales diabéticos tratados con la mezcla de extractos de la hoja de *Smallanthus sonchifolius* y extracto de semillas de *Vitis vinifera* ("YACON"+"UVA") durante siete días de tratamiento. (B) Análisis de los datos obtenidos de los *Rattus norvegicus albinus* tratados con Aloxano®, Glibenclamida® y la mezcla de los extractos de hojas de *Smallanthus sonchifolius* y el extracto de semillas de *Vitis vinifera* ("YACON"+"UVA") usando el área bajo la curva (AUC). Parámetros de significancia; ****: $p < 0,001$; ***: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$. Finalmente, para saber si existía una acción hipoglucemiante del sinergismo de *Smallanthus sonchifolius* y de *Vitis vinifera*, decidimos evaluar esta mezcla de los extractos en *Rattus norvegicus albinus* diabéticos, estos resultados fueron comparados a los resultados obtenidos también en grupos de animales diabéticos tratados con extracto de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de las semillas de *Vitis vinifera* analizados independientemente.

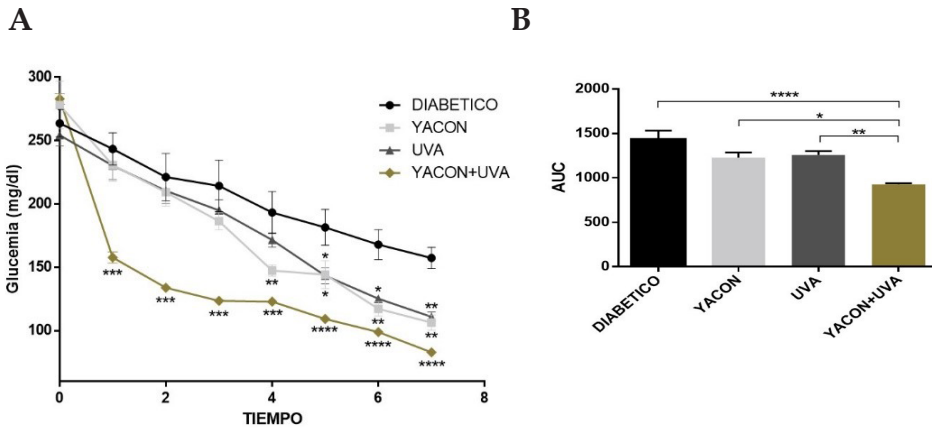


Fig. 6: Efecto hipoglucemiante de la mezcla del extracto de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de las semillas de *Vitis vinifera* sobre las *Rattus norvegicus albinus* diabéticos. (A) Curvas glicémicas de los grupos CONTROL ("ratas" diabéticos), grupo tratadas con el extracto de hojas de *Smallanthus sonchifolius*, tratadas con el extracto de semillas de *Vitis vinifera* y ratas diabéticas tratadas con la mezcla de los extractos de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de las semillas de *Vitis vinifera* ("YACON"+"UVA") durante siete días de tratamiento. (B) Análisis de los datos obtenidos de los animales tratados con Aloxano®, extracto de hojas de *Smallanthus sonchifolius*, extractos de semillas de *Vitis vinifera* y la mezcla de los extractos de hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de semillas de *Vitis vinifera* ("YACON"+"UVA") usando el área bajo la curva (AUC). Parámetros de significancia; ****: $p < 0,001$; ***: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$; *: $p < 0,1$. Los resultados obtenidos en esta parte del estudio son mostrados en la Fig. 6A, donde se observa que la mezcla de los extractos de hojas de *Smallanthus sonchifolius* y de semillas de *Vitis vinifera* tuvo diferencias significativas en todos los puntos analizados (7 horas) cuando fueron comparados con el grupo control (DIABETICO), además también es observado que el sinergismo fue más eficiente que los extractos de las hojas de "Yacón" y semillas de "Uva" evaluados independientemente, estos datos fueron confirmados al usar los datos obtenidos y analizados en el área bajo la curva (AUC). En la Fig. 6B, estos resultados comprueban la acción sinérgica de los extractos de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* y extractos de semillas de *Vitis vinifera* para la acción hipoglucémica en *Rattus norvegicus albinus* diabéticos. Finalmente, por los resultados mostrados anteriormente se observa que el grupo de tratamiento de la sinergia de *Smallanthus sonchifolius* más *Vitis vinifera* presenta mejor efecto hipoglucemiante comparado con los otros grupos de estudio.

Discusión

En la evaluación del estudio de mortalidad de los extractos del *Smallanthus sonchifolius* "Yacón" y *Vitis vinifera* "Uva" se hallaron que la dosis letal media (DL50) estimada está por encima de los 2000 mg/kg (Tabla 3), que según las normas Europeas (The Organisation for Economic

Cooperation and Development, 1995; Arencibia et al., 2009), para la clasificación de la toxicidad aguda oral, se considera no tóxico.

En el estudio con dosis repetidas se observó que las hojas del *Smallanthus sonchifolius* y las semillas del *Vitis vinifera* durante 28 días, no hubo mortalidad ni

síntomas tóxicos evidentes, además de no existir alteración alguna de parámetros físicos y de comportamiento evaluados. El peso corporal es un indicador que involucra una serie de cambios orgánicos, es por ello que una variación sugiere algún efecto adverso de drogas y se considera significativa si hay una disminución de más del 10% del peso corporal inicial (Ramesh *et al.*, 2007). Este indicador, en nuestro estudio se registró comportamiento normal de ganancia de peso y no se encontraron diferencias significativas (Tabla 4).

Por otro lado, los exámenes hematológicos y de química sanguínea son de gran valor en los ensayos toxicológicos a largo plazo y los resultados pueden correlacionarse con los posibles daños sobre un órgano específico (Kim & Lee, 1992). Los valores obtenidos en los indicadores hematológicos (Tabla 6) no mostraron alteraciones importantes, las variaciones encontradas están dentro del rango establecido por el grupo control (González *et al.*, 2006). Sin embargo, dentro de los indicadores bioquímicos se observó un incremento leve en los valores de ALT, por encima del valor normal (Tabla 5), lo cual podría indicar algún daño hepático. La enzima ALT es citosólica y se encuentra en concentraciones más altas en hepatocitos, de manera que el incremento en el suero podría ser debido a modificaciones de la permeabilidad transmembrana o daño celular, por eso es considerado como un indicador altamente sensible de hepatotoxicidad (Tasayco, 2007).

Los modelos experimentales de diabetes inducido a "ratas" han sido ampliamente utilizadas por investigadores en todo el mundo, en el presente estudio se optó por el método químico de supresión endocrina del páncreas, los cuales exhiben todos los eventos bioquímicos, hormonales y

morfológicos que ocurren durante y después de la inducción del estado diabetogénico (Nimenibo, 2003; Castañeda, 2008). Varios agentes químicos son citotóxicos para las células beta del páncreas, el aloxano y la estreptozotocina han sido sistemáticamente investigados y son ampliamente empleados para inducir diabetes en los animales (Gold *et al.*, 1981; Yegen, 1995; Masson, 2003).

La dosis efectiva o letal del aloxano o estreptozotocina varía considerablemente entre las especies y son altamente sensibles a la edad, sexo y estado nutricional de los animales (Gold *et al.*, 1981; Masson, 2003). Estudios demuestran amplia variación de la dosis del aloxano en la inducción de *Diabetes mellitus* experimental a "ratas", entre ellos podemos mencionar que se han empleado dosis de 135 mg/kg diluido en agua destilada (5%) vía intraperitoneal (Mello, 1995), 130 mg/kg vía intraperitoneal (Yegen *et al.*, 1995) 100 mg/kg en buffer citrato (pH 4.75) (Kodama, 1993) en el presente estudio se usó 100 mg/kg en solución salina fisiológica vía intraperitoneal. Se ha postulado que el aloxano produce una masiva reducción en la liberación de insulina por la destrucción selectiva de las células beta de los islotes de Langerhans que han sido atribuidas a la generación de radicales libres tóxicas que inducen ruptura del DNA (Masson, 2003).

En nuestro estudio las "ratas" inducidas a *Diabetes mellitus* los niveles de glucosa fueron superiores y significantes con respecto al grupo control (Tabla 8) y, además de presentar hiperglucemia se observó aumento de volumen en la orina, olor fuerte en la orina, pérdida de peso, caída de pelos y debilidad general; estas observaciones también fueron reportados por otros autores (López *et al.*, 2001; Zanoello, 2002), las "ratas" del grupo control presentaron niveles de glucosa normal, ligero aumento

de peso, buen estado general y la ingesta de agua y diuresis fue menor que los grupos diabéticos.

En la Tabla 8 podemos observar que los niveles de glucosa disminuyen durante los siete días de tratamiento siendo mayor y significativo ($p < 0.05$) para el grupo de la sinergia de los extractos de "Yacón" y extractos de uva comparados con los otros grupos de tratamiento. Nuestros resultados son compatibles con otros estudios, (Tasayco, 2007) demostró la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de "Yacón" durante 30 días de tratamiento y sugiere que actuaría mejorando la concentración de insulina en sangre.

Aybar *et al.*, 2001, demostró que la infusión de hojas de "Yacón" administrado a "ratas" diabéticas tenía efecto hipoglicemiante, por su parte (Volpato *et al.*, 1997) demostró que el extracto acuoso de las hojas de "Yacón" disminuyen los niveles de glucosa en "ratas" diabéticas y que no alteran los niveles de glucosa sanguínea en "ratas" normales. Por otro lado, las acciones farmacológicas de los extractos de semillas de *Vitis vinifera* se han atribuido en gran medida a las proantocianidinas, poderoso antioxidante, capturadores de radicales libres (Valls, *et al.*, 2000; Ciudad & Valenzuela, 2002; Vásquez, *et al.*, 2002). Ciertas patologías como la diabetes, generan durante su desarrollo un enorme daño por estrés oxidativo y una de las numerosas manifestaciones de la elevada producción de radicales libres, es la disfunción endotelial (Baynes & Thrope, 1999). En estudio pre clínico realizado por (Bustamante *et al.*, 2002) determinaron que el extracto seco estandarizado de *Vitis vinifera* es capaz de revertir la disfunción endotelial asociada a la *Diabetes mellitus*, en aorta de "ratas", restaurando la función del

endotelio vascular a un nivel comparable a la que se observa en animales sanos. En una comparación entre los compuestos bioactivos de la semilla de "uva" y las vitaminas C y E, las proantocianidinas resultaron ser más efectivas como secuestradores de radicales libres en diversos ensayos *in vitro* e *in vivo*, mostrando además un importante efecto hepatoprotector por un mecanismo asociado a su capacidad antioxidante (Sandoval, 2008). Dentro de la gran variedad de antioxidantes naturales, el extracto de semillas de *Vitis vinifera* ha recibido especial atención y destaca por sus cualidades y estaría contribuyendo a evitar la aparición de patologías como es el caso de la diabetes mellitus (Bagchi *et al.*, 2000; Oliboni *et al.*, 2011).

En nuestro estudio la sinergia del extracto acuoso de semillas de *Vitis vinifera* y del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smalanthus sonchifolius* demostraron tener actividad hipoglicemiante probablemente por disminuir el estrés oxidativo y por mejorar la secreción de insulina por el páncreas en ratas inducidas a *Diabetes mellitus* (Tasayco, 2007). Es ampliamente aceptado que la *Diabetes mellitus* incrementa la producción de radicales libres derivados del oxígeno, anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH) en cantidades superiores a los niveles fisiológicos, los que sobrepasan la capacidad antioxidante celular endógena (estrés oxidativo) y, como resultado, hay una modulación negativa de la actividad biológica del óxido nítrico (NO) (Saskia, 1998; Kasoer *et al.*, 2005).

Los flavonoides son apreciados por su amplia actividad farmacológica pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN, quelar iones metálicos transitorios, tales como hierro, cobre y zinc, catalizan

el transporte de electrones y depurar radicales libres (Bagchi *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003). Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como *Diabetes mellitus*, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Bustamante *et al.*, 2002; Paladino & Zuritz, 2011; Esquivel-Gutierrez *et al.*, 2012). Por tanto no es de extrañar que los extractos en estudios protejan de las complicaciones producidas por la diabetes y esto es compatible con nuestros resultados de estudios de efectos adversos.

Conclusiones

Se detectaron por el tamizaje fitoquímico, la presencia de: Compuestos fenólicos, Taninos, Flavonoides, Cumarinas y Quinonas en la Semillas del *Vitis vinifera* "Uva". Asimismo en las hojas del *Smallanthus sonchifolius* "Yacón": Compuestos fenólicos, Taninos, Flavonoides, Esteroides y Glucósidos.

La sinergia del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* "Yacón" y el extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinifera* "uva" tienen actividad hipoglucemiante en "ratas" inducidas a *Diabetes mellitus*, su probable mecanismo de acción es que mejorarían la concentración de insulina en sangre y disminuyen el estrés oxidativo producido por la diabetes.

El extracto hidroalcohólico de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* "Yacón" y el extracto acuoso de las semillas del *Vitis vinifera* "uva" según nuestro diseño experimental de toxicidad aguda y a dosis repetidas por 28 días no son tóxicos, sin embargo se debe tener presente que se encontró un ligero aumento en los niveles de transaminasa.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Cervantes Liñan. Rector de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por permitirnos el acceso al equipamiento de los Laboratorios de Ciencias Básicas y de Especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la U. I. G. V. A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Lima, Perú, por el financiamiento.

Contribución de los autores

H. V. C. participó en la concepción y diseño del estudio, en el análisis e interpretación de datos, redacción del manuscrito, revisión crítica del artículo y la aprobación de la versión final a publicar. L. V. B. contribuyó con la información botánica y recolección de las especies vegetales materia del presente estudio y apoyo logístico. M. P. P. contribuyó con el estudio fitoquímico de las especies vegetales, los análisis de glicemia, manipulación de los animales de experimentación y con la recolección de resultados. V. P. C. contribuyó en la redacción del manuscrito, revisión crítica del artículo y la aprobación de la versión final a publicar

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Literatura citada

- Al-Habori, M.; A. Al-Aghbari; M. Al-Mamary & M. Baker. 2002. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol* 83, 209-217.
- Andriambelosen, E.; C. Magnier; G. Haan-Archipoff; A. Lobstein; R. Anton; A. Beretz *et al.* 1998. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr.* 128(12): 24-33.
- Arana-Ventura, J.; J. Villacrés; R. Mego & H. Delgado. 2014. Efecto de los extractos de *Geranium ayavacense* W. (Pasuchaca) sobre la glicemia en

- ratas con diabetes mellitus experimental. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 31(2): 261-266.
- Arencibia, D.; L. Rosario; Y. López; M. Fariñas; J. Infante; D. Díaz; *et al.*** 2009. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda. Retel Rev. Toxicología. 22(1): 1-15.
- Aybar, M.; A. Sánchez Riera; A. Grau & S. Sánchez.** 2001. Hypoglycemic effect of the water extracts of *Smalanthus sonchifolius* (Yacon) leaves in normal and diabetic rats Journal of Ethnopharmacology. 74: 125-132.
- Bagchi, D.; M. Bagchi; S. Stohs; D. Das; S. Ray & C. Kuszynski, C.** 2000. Prueba HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Rev. Toxicology. 148: 187-197.
- Baroni, S.; F. Suzuki-Kemmelmeier; S. Caparroz-Assef; R. Nakamura Cuman & C. Bersani-Amado.** 2008. Effect of crude extracts of leaves of *Smalanthus sonchifolius* (Yacon) on glycemia in diabetic rats. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, Nº 3: 521 – 530.
- Baynes, J. W. & S. R. Thrope.** 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. Diabetes, 48:1-9.
- Brein, L.** 1990. Estudio comparativo entre o transplante total de páncreas, transplante de ilhotas de langerhans, e o tratamento convencional com insulina no controle das manifestacoes clínicas do diabetes aloxânica no rata (Dissertacao Mestrado) Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu.
- Boyle, J. P.; A. A. Honneycutt; K. M. Narayan; T. J. Hoerger; L. S. Geiss; H. Chen; *et al.*** 2001. Projections of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in US. Diabetes Care 24:1936-1940.
- Bussmann, R.** 2011. Traditional knowledge for modern ailments – plants used for the treatment of diabetes and cancer in Northern Perú. J Med Plants Res. 5 (31): 16-30.
- Bussmann, R.** 2013. The globalization of traditional medicine in Northern Perú: from shamanism to molecules. Evid Based Complement Alternat Med. 291 - 303.
- Bustamante, S.; J. Muñoz; R. Gallardo; H. Figueroa & M. Morales.** 2002. El extracto de *Vitis vinifera* revierte la disfunción vascular aórtica inducida por diabetes en ratas. Sociedad Asturiana de Fitoterapia, III Congreso Internacional de Fitoterapia Técnicas afines, Ciudad de Oviedo, España. 93 - 98.
- Castañeda, B.; R. Castro de la Mata; R. Manrique; L. Ibáñez; R. Fujita & E. Mendoza.** 2008. Estudio Fitoquímico y Farmacológico de 4 Plantas con efecto hipoglucemiante. Revista Horizonte Médico 8 (1): 6 - 34.
- Ciudad, C. & J. Valenzuela, J.** 2002. Contenido de flavonoides en uvas para vino cultivadas en valle de Casablanca, Chile. Agricultura Técnica (Chile). 62 (1): 79-86.
- Cohelo, R. J. L.; G. Vendramin & D. Navarro.** 2002. Aálise fitoquímica das folhas da *Polymnia sonchifolia* (Yacón). XI encontro Anual de Iniciação Científica. Maringá.
- Daóková, K.; J. Frec; L. Cvak; V. Simánek & J. Ulrichová.** 2001. Extracts from *Smalanthus sonchifolius* leaves-characterization and biological activity. II Simposio Latinoamericano de Raíces y Tubérculos: Guía del participante, 28 - 30 de noviembre. Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú.
- Davis, S. & D. Granner.** 2003. Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. En: Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10º edición. México: Mc Graw Hill Interamericana. p. 1697 – 1733.
- Domínguez, A.** 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Limusa.
- Day, C. & C. J. Bailey.** 1988. Hypoglycaemic agents from traditional plant treatments for diabetes. Int Ind Biotech. 8 (3). 5-8
- Esquivel-Gutiérrez, E.; R. Noriega-Cisneros; M. Bello-González; A. Saavedra-Molina & R. Salgado-Garciglia.** 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades anti-diabéticas y antihipertensivas. Rev. Biológicas. 14 (1): 45 - 52.
- Facino, R.; M. Carini; G. Aldini; P. Bombardelli & R. Morelli.** 1994. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*. Arzneim-Forsch. 44: 592 – 601.
- Ganoza, M.** 2001. Fundamentación Química de las Reacciones de coloración y Precipitación en la identificación de Metabolitos Secundarios de Plantas Medicinales. Tesis para optar el Título

- Profesional de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo.
- Gold, G.; M. Manning; R. Heldt; J. R. Pettit & G. M. Grodsky.** 1981. Diabetes induced with múltiple subdiabetogenic doses of streptozotocin. Lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes* 30: 634-638.
- González, E.; A. Pak; M. Pinto; M. López; J. Felicio & M. Rossi.** 2003. Actividade inibidora da producao de Aflatoxina B1 por um flavonóide isolado de *Polimnia sonchifolia*. Sociedad Brasileira de Química.
- González, Y.; I. Scull; A. Bada; D. Fuentes; B. González; M. Arteaga; et al.** 2006. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (Yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev. Cubana Plant Med.* 11 (2):
- Grau, A.; A. M. Kortsarz; M. J. Aybar; A. N. Sánchez Riera & S. S. Sánchez.** 2001. El retorno Del Yacón. *Ciencia Hoy.* 11(63):
- Gordillo, G.; P. Negrón; T. Zúñiga; E. Flores; R. Moreyra; C. Fuertes; et al.** 2012. Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de las hojas de *Smalanthus sonchifolius* (Yacón) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Ciencia e Investigación* 15 (1): 42 - 47.
- Habib, N.; S. Honoré; S. Genta & S. Sánchez.** 2011. Efecto hipoglicemiante de *Smalanthus sonchifolius* (Yacón) raíces en ratas diabéticas: enfoque bioquímico. *Chem Biol Interact.* 194 (1): 31-9.
- Inoue, A.; S. Tamogami; H. Kato; Y. Nakazato; M. Akiyama; O. Kodama; et al.** 1995. Antifugal melampolides from leaf extracts of *Smalanthus sonchifolius*. *Photochemistry.* 39 (4): 845 - 849.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática.** 2016. Indicadores de Programas Presupuestales, 2011 – 2015. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1396/libro.pdf (revisado el 01 de junio del 2018).
- Kim, O. K. & E. B. Lee.** 1992. The Screening of plants for hypoglycemic Action in normal and alloxan-induced hyperglycemic rats. *Korean J Pharmacog.* 23 (2): 117-119.
- Kasper, D. L.; A. S. Fauci; D. L. Longo; E. Braunwald; S. L. Hauser & J. L. Jameson.** 2005. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York, McGraw-Hill. Medical Publishing División.
- Kodama, T.; M. Iwase & K. Nunoi.** 1993. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. *J Diabetes Res Clin Pract, Ireland.* 183 - 189.
- López, G.; P. Ventura; R. Rodríguez; B. Casas; P. Hernández & G. Arias.** 2001. Efectos de un extracto Hidroalcohólico de *Bidens alba* en ratas normales y con diabetes aloxánica. *Acta Farm. Bonaerense.* 20 (2): 89 - 93.
- Masson, M. L.; C. T. Spadella; J. L. M. Machado & S. A. Schellini.** 2003. Caracterizacáo de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana en ratos. Estudio clínico e laboratorio. *Acta cirúrgica Brasileira.* Vol 18(2):
- Mcphee, S. & W. Ganong.** 2000. Trastornos del páncreas endocrino. En: Fisiopatología médica una introducción a la medicina clínica. México. Manual Moderno.
- Mello, M. A. & E. Luciano.** 1995. Effects og protein malnотriron on glucosa tolerante in rats with alloxan-induced. *Braz J Med Res.* 467 - 470.
- Mendocilla, M. & M. Villar.** 2001. Monografía de plantas medicinales: Manual de Fitoterapia. Lima: Seguro Social de Salud-Es Salud; 2001. 265 - 267.
- Minaño, A.; J. Chico; E. López; M. Sisneigas & M. Bobadilla.** 2004. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antioxidantes a partir de cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. VAR. Red Globe. *Rev Perú biol.* 11 (2): 187 - 192.
- Mullins, M.** 1992. Biology of the grapevine (Biology of horticultural crops). Cambridge University Press. 37-80.
- Nimenibo-Uadia, R.** 2003. Effect of aqueous extract of *Canavalia ensiformis* seeds on hyperlipidaemi and hyperketonaemia in alloxan-induced diabetic rats. *Biochemistry.* 15 (1): 7-15.
- O'Brien, R. M. & D. K. Granner.** 1996. Regulation if gene expression by insulin. *Physiological Reviews* 76:1109 - 1161.
- Orlandi, N.; E. Álvarez; T. Gonzales & K. Gonzales.** 2012. Guías de prácticas clínicas. *Diabetes Mellitus* tipo 2. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas.
- OECD.** 1995. Guidelines for the Testing of Chemicals. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Nº 47. Disponible en: <http://www.oecd.org>.
- Oliboni, S.; C. Dani; C. Funchal; J. Henriques & M. Salvador.** 2011. Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and

- conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. *bordo*) on Wistar rat tissues. An. Acad. Bras. Cienc. 83 (4): 1403 – 1411.
- Orhan, N.; M. Aslan; D. Orhan; F. Ergun & E. Yesilada.** 2006. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. J Ethnopharmacol. 108 (2): 280 - 286.
- Paladino, S. & C. Zuritz.** 2011. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: Eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción. Rev. Fca. Uncuyo. ISSN 0370-4661. Tomo 43. N° 1. 187-199.
- Piniés, J. A.** 2008. Complicaciones agudas y crónicas, un riesgo que debe ser evitado. Rev. Esp Econom Salud 7(2): 64-67.
- Ramesh, T.; K. Lee; H. Lee & S. Kim.** 2007. Acute oral toxicity study of *Asiasari radix* extract in mice. International Journal of Toxicology. 26 (1): 247-251.
- Reyes, F.; M. Pérez; E. Alfonso; Y. Céspedes & E. Ardevol Proenza.** 2015. Las incretinas como nueva opción terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2. Revista Cubana De Medicina. 54 (2): 151-166.
- Rodriguez, L. G.** 2003. Insulinoterapia. Rev. Med. Herd. 14 (3): 140-144.
- Saldaña-Balmori, Y.; B. Ramírez-González & H. Delgado – Gutiérrez.** 2003. Acción de algunos antiinflamatorios no esteroideos sobre la lipoperoxidación hepática, inducida por etanol. Rev Cubana Invest Biomed 22 (1): 16-24.
- Sanabria, A.** 1983. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Facultad de Ciencias, departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Sandoval, M.; K. Lazarte & I. Arnao.** 2008. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L. (Uva). Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición Alberto Guzmán Barrón. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. An Fac Med. 69 (4): 250-259.
- Saskia, A. B. E.; A. Van & A. Bast.** 1998. Estructural Aspects of antioxidant activity of flavonoids. En: Flavonoids in health and disease. Ed. Marcel Dekker, INC. New York. 9: 221 - 251.
- Sato, K.; V. Migliaccio; J. M. Do Carmo; M. C. Oliveti; R. S. Ferreira & V. P. S. Fazan.** 2006. Diabetes como modelo de neuropatía autonómica. Medic. Ribeirao Preto. 39 (1): 28 - 38.
- Scola, G.; V. Kappel; J. Moreira; F. Dal-Pizzol & M. Salvador.** 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of winery wastes seeds of *Vitis labrusca*. Ciencia Rural, 41 (7): 1233-1238.
- Shi, J.; J. Yu; J. Pohorly & Y. Kakuda.** 2003. Polyphenolics in grape seeds: biochemistry and functionality. J. Medicinal Food. 6 (4): 291 - 299.
- Sing, K. N. & V. Chandra.** 1977. Hypoglycaemic and hypocholesterolaemic effects of proteins of seeds in young albino rats. J Indian Med Assoc. 201 - 203.
- Tasayco, Y.** 2007. Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Smalanthus sonchifolius* (Yacón) en ratas con diabetes tipo 1 y 2. (Tesis de maestría). Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- The European Parliament and The Council of The European Union.** 2010. Directive 2010/63/EU of The European Parliament and of The Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes: Annex IV Methods of killing animals. Official Journal of the European Union [Internet]. Strasbourg, Francia, September 22, 2010 [citado el 14 de Febrero de 2014]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF>.
- Tiwari, A. & J. Rao.** 2002. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals; Present status and future prospects. Current Science 83 (1): 30-38.
- UICN, OMS, WWF.** 1993. Directrices sobre conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de la salud (OMS), Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y Word Wild Life (WWF), Gland, Switzerland
- Unión Europea.** 2000. Decisión 2000/368/CE de la Comisión: Aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. Diario Ofi. 136: 108 - 125.
- Vásquez, M.; S. González; N. Risler; A. Ponce; M. Cruzado & R. Miatello.** 2002. Un antioxidante natural, resveratrol, previene cambios bioquímicos cardiovasculares en ratas con un modelo de Síndrome X [resumen en Internet]. Mendoza, Argentina: Sociedad Argentina de Cardiología.
- Valls, J.; M. Lampreave; M. Nadal & L. Arola.** 2000. Importancia de los compuestos fenólicos en la

calidad de los vinos tintos de crianza. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili.

- Vega, R. & C. Carrillo.** 1997. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto de *Ocimum gratissimum* L. ("Orégano cimarrón"). Rev. Cub. Plan. Med. 2 (2-3): 14-18.
- Villavicencio, M.** 1995. Mecanismos moleculares y bioquímicos de la acción de la insulina. La diabetes mellitus y los avances en su tratamiento. Lima. Editorial Buenaventura.
- Volpato, G.; F. Vieira; F. Almeida; F. Cámara & I. P. Lemonica.** 1997. Study of the hypoglycemic effects of *Polymnia sonchifolia* leaf extracts in rats. World congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. Mendoza, Argentina.
- Wolford, S.; R. Schroer; F. Gohs; P. Gallo; M. Brodeck; H. Falk; et al.** 1986. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. J Toxicol Environm Health 18: 161 - 188.
- Yegen, E.; F. Akcay & M. R. Yigitoglu.** 1995. Plasma atrial natriuretic peptide levels in rabbits with alloxan monohydrate-induced diabetes mellitus. J Japan Heart. 789- 795.
- Zanoello, A.; C. Mellazo-Mazzanti; G. J. Kerpel; A. Filappi; D. Prestes & M. Cecim.** 2002. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes mellitus inducido por Aloxano em Ratos. Acta Farm, Bonaerense. 21 (1): 31 - 36.

ANEXO 1

Recolección y Procesamiento de la Muestra



Fig. 7: A. Recolección de las muestras; B. Obtención de las semillas; C. Molienda; D. Peso muestras secas; E. Extractos; F. Extracto seco.

ANEXO 2

Inducción Experimental de Diabetes Mellitus a *Rattus norvegicus albinus*



Fig. 8: A. Adquisición de ratas en el Instituto Nacional de Salud; B. Minibiobioterio Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica; C. Aclimatación; D. Inducción; E. Ratas diabéticas; F. Determinación de glucosa en sangre de ratas.

ANEXO 3

Actividad Hipoglucemiante *Smalanthus sonchifolius* (YACON) + *Vitis vinifera* (UVA)



Fig. 9: A. Administración yacón + uva, vía oral mediante cánula intragástrica; B. Ratas al finalizar el tratamiento; C. Punción en el ápice de las colas; D. Determinación de glucosa en sangre de ratas.

