



FIGURA 1. Inca sayre (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham).
Foto: Álvaro Paredes (www.sunaqperu.com).

Evaluación preclínica y clínica de la actividad hipoglucemiante de Inca sayre (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham) en diabetes mellitus tipo 2

Gladys Moscoso-Mujica ^{a, b}

Ángel Mujica ^c

Carlos Vegas ^d

Magaly Villena ^b

Humberto Alvizuri ^e

^a Universidad de San Martín de Porres-Filial Sur, Arequipa-Perú

^b Facultad de Farmacia y Bioquímica- Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco-Perú

^c Escuela de Postgrado-Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú

^d Universidad Privada San Juan Bautista, Lima-Perú

^e Hospital Antonio Lorena del Cusco-Perú

Dirección de contacto:

Gladys Angélica Moscoso-Mujica

Universidad de San Martín de Porres-Filial Sur
La Merced 209 Cercado, Arequipa-Perú.

Tel: +51 054 241839

E-mail: gladysmoscoso03@gmail.com

Resumen

Inca sayre (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham, sinónimo: *Notholaena nivea* (Poirot) Desv.) es una *Pteridaceae* de la región andina del Perú usada en etnomedicina tradicional incaica. El objetivo de este estudio fue realizar la evaluación preclínica y clínica de la actividad hipoglucemiante del extracto de Inca sayre en diabetes mellitus tipo 2. Se realizó la evaluación preclínica de toxicidad aguda en ratones y la actividad hipoglucemiante en ratas con diabetes experimental y normoglucémicas. La evaluación clínica se efectuó en voluntarios normoglucémicos y pacientes diabéticos tipo 2. Los resultados mostraron actividad hipoglucemiante del extracto tanto en evaluación preclínica como en clínica. En voluntarios normoglucémicos el extracto disminuyó la glucemia basal en un 11% ($p \leq 0,05$). En diabéticos tipo 2 redujo la glucemia basal un 9,0%, 8,2% y 6,2%, en el tercer, quinto y séptimo día, respectivamente, en relación al tratamiento con anti-diabéticos orales ($p \leq 0,05$), y 21,2%, 20,4% y 18,6%, respectivamente, en relación al placebo ($p \leq 0,05$). Además, presentó mayor control metabólico de glucemia en la prueba de tolerancia a la glucosa (PTOGA).

Palabras clave

Argyrochosma nivea, *Notholaena nivea*, actividad hipoglucemiante, diabetes mellitus tipo 2.

Avaliação pré-clínica e clínica da actividade hipoglicémica de "Inca sayre" (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham) na diabetes mellitus Tipo 2

Resumo

"Inca sayre" (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham, sinónimo: *Notholaena nivea* (Poiret) Desv.) é uma *Pteridaceae* da região andina do Peru utilizada na etnomedicina tradicional inca. O objetivo deste estudo foi realizar a avaliação pré-clínica e clínica da actividade hipoglicémica do extracto deste feto na Diabetes Mellitus Tipo 2. Com esse objetivo, realizaram-se estudos pré-clínicos em ratinhos e efectuou-se a avaliação da actividade hipoglicémica em ratos com diabetes experimental e normoglicémicos. A avaliação clínica foi realizada em voluntários normoglicémicos e em doentes com diabetes tipo 2. Os resultados mostraram atividade hipoglicémica do extracto tanto na avaliação pré-clínica como na clínica. Os níveis de açúcar no sangue em voluntários normoglicémicos diminuíram 11% em relação à linha de base ($p \leq 0,05$). Nos doentes com diabetes tipo 2 a redução da glicemia basal, em comparação com os antidiabéticos orais foi de 9,0%, 8,2% e 6,2% no terceiro, quinto e sétimo dia, respectivamente ($p \leq 0,05$); comparativamente com o placebo a redução verificada foi de 21,2%, 20,4% e 18,6%, no terceiro, quinto e sétimo dia, respectivamente ($p \leq 0,05$). A utilização do extracto apresentou ainda um maior controle metabólico da glicemia após a prova de tolerância à glicose oral (PTGO).

Palavras-chave

Argyrochosma nivea, *Notholaena nivea*, actividade hipoglicémica, diabetes mellitus tipo 2.

Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, de prevalencia elevada a nivel mundial. Es causa importante de morbilidad y mortalidad, y se estima que para el año 2040 habrá 642 millones de personas con diabetes mellitus, con una prevalencia del 7,7%⁽¹⁻³⁾. Se calcula que 3,96 millones de adultos diabéticos mueren a causa de la diabetes cada año, y esta enfermedad es responsable de 6,8% de todas las causas de muerte^(1, 4) ocasionando un elevado costo económico para la administración sanitaria⁽⁵⁾. En el año 2016, en Perú, la diabetes mellitus ocasionó el 2% de mortalidad en todas las edades, con una prevalencia del 6,4% en varones y 7,5% en mujeres⁽⁶⁾.

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por la secreción anormal de la insulina por parte de las células β -pancreá-

Preclinical and clinical evaluation on the hypoglycemic activity of Inca sayre (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham) in type 2 diabetes mellitus.

Abstract

Inca sayre (*Argyrochosma nivea* (Poir.) Windham, synonym: *Notholaena nivea* (Poiret) Desv.) is a *Pteridaceae* of the Andean region of Peru used in Incan traditional medicine. The aim of this study was to perform the preclinical and clinical evaluation of the hypoglycemic activity of Inca sayre extract in type 2 diabetes mellitus. For this, preclinical evaluation of acute toxicity in mice, and hypoglycemic activity in normoglycemic rats and with experimentally induced diabetes was performed. Clinical evaluation was done in normoglycemic volunteers and type 2 diabetic patients. The results showed hypoglycemic activity of the extract in both preclinical and clinical evaluations. The blood sugar levels in normoglycemic volunteers decreased 11% in comparison to the baseline ($p \leq 0.05$). In type 2 diabetic patients reduced 9.0%, 8.2% and 6.2% on the third, fifth and seventh day, respectively, in relation to oral antidiabetics ($p \leq 0.05$), and 21.2%, 20.4% and 18.6%, respectively, in relation to placebo ($p \leq 0.05$). In addition, the extract produced greater metabolic control of glycaemia in glucose tolerance test (PTOGA).

Keywords

Argyrochosma nivea, *Notholaena nivea*, hypoglycaemic activity, type 2 diabetes mellitus.

ticas, y un estado de resistencia a la insulina que afecta a la musculatura estriada. Como consecuencia, origina un estado crónico de hiperglucemia, que afecta a diferentes órganos y sistemas, en especial al sistema cardiovascular y neurológico^(7, 8). Además, existe relación entre la diabetes tipo 2, edad, obesidad y falta de ejercicio, e indican que la obesidad es un factor de riesgo importante en el desarrollo de este tipo de diabetes, y el tejido adiposo abundante origina resistencia a la insulina, e hiperglucemia⁽⁹⁾. El tipo de diabetes más frecuente es la de tipo 2 (90% de los casos mundiales). Presenta una elevada morbi-mortalidad con complicaciones microvasculares (insuficiencia renal crónica terminal, retinopatía y ceguera, etc.) y macrovasculares, que determinan las altas cifras de mortalidad en diabetes mellitus tipo 2^(7, 9). En estos últimos años se han visto el

aumento dramático en la incidencia y prevalencia de diabetes tipo 2 en todos los grupos de edad, particularmente en las personas mayores y también se está observando un aumento de incidencia en niños ^(1,6). En el año 2012 fueron 4,8 millones las muertes causadas por esta enfermedad ⁽¹⁰⁾.

El desarrollo de la enfermedad puede prevenirse o retrasarse en personas con tolerancia a la glucosa alterada, mediante implementación de los cambios de estilo de vida o el uso de agentes terapéuticos. En este sentido, la diabetes tipo 2 es un problema de salud pública que nos alerta, e impulsa a gestionar las políticas terapéuticas, para mejorar la prevención, y tratamiento de la enfermedad, para lo cual, se propone buscar alternativas terapéuticas en las plantas. Cabe recordar que a partir de la galegina, aislada de *Galega officinalis* L., se sintetizó el antidiabético oral metformina, con una estructura similar a la de la galeguina ⁽¹¹⁾.

El uso de plantas medicinales en el Perú es tan antiguo como la cultura andina inca. Estos conocimientos se encuentran arraigados en el saber popular. Sin embargo, la aparición de otras herramientas terapéuticas ha hecho que estos conocimientos sean progresivamente relegados y olvidados, en buena parte debido a la falta de estudios preclínicos y clínicos para validar científicamente los usos tradicionales ^(12,13). En medicina tradicional de los andes peruanos se atribuye actividad hipoglucemiante a las partes aéreas de inca sayre (*Argyroschisma nivea* (Poir.) Windham, *Pteridaceae*) ^(14,15).

Inca sayre, también llamada cuti-cuti, doradilla, tabaco del inca o cobocita ⁽¹⁶⁾, es un helecho con hábito de hierba perenne, que presenta un rizoma corto, grueso, erecto o algunas veces oblicuo, cubierto de escamas linear-subuladas, frecuentemente enroscadas, con los márgenes más o menos enteros; con frondas de 10 a 30 cm, cortamente peciolado, cuya lámina es bi a tripinnada, lanceolada, deltoidea u ovalada, con hasta doce pares de pinneas subpuestas, últimos segmentos suborbiculares a anchamente oblongos, enteros o lobulados ^(17,18). Se caracteriza por tener la superficie abaxial densamente blanca o amarillo blanquecina, con esporangios sobre la parte terminal a la mitad de la vena y borde no modificado ^(19,20) (FIGURAS 1 y 2). Es una planta xerófila ⁽¹⁸⁾ que crece en sitios rocosos entre 2600 a 4400 m de altitud, en Perú (provincias de Cusco, Huancaavelica, Cajamarca, Puno y Arequipa), México, Ecuador, Bolivia, Chile y Argentina ^(21,22).

El presente trabajo tiene por objetivo analizar la potencial utilidad de esta planta en la diabetes tipo 2 en base a los conocimientos existentes y los nuevos resultados que se presentan aquí.



FIGURA 2. Inca sayre mostrando su superficie abaxial. Foto: Álvaro Paredes (www.sunaperu.com).

En la etnomedicina andina inca la mayoría de las plantas cuyos nombres contenían la palabra "Inca" eran empleados para disminuir glucosa en sangre ⁽²³⁾. Wollenweber *et al.* ⁽²⁴⁾ evaluó los componentes principales de *Notholaena nivea* var. *nivea* recolectada en Perú, reportando que el componente principal del exudado de la fronda del helecho era dihidrostilbeno, acompañado de flavonoides. También evaluó algunas especies estudiadas por Tryon ⁽²⁵⁾, quien reportó a *Notholaena*, como la especie *N. nivea* que comprendía cuatro variedades, como *nivea* y *oblongata* con un indumento blanco, *tenera* sin indumento y *flava* con un indumento amarillo; en todas ellas encontró el mismo patrón de flavonoides ⁽²⁶⁾. Además, de 5 muestras de *N. chilensis*, 7 muestras de *N. dealbata*, 20 muestras de *N. limitaena* y *N. nivea*, encontraron que todas contenían ácido isonotolaénico. A diferencia de la variedad *mexicana* que contenía ácido notolaénico. Todas estas especies se incluyen en el nuevo género *Argyroschisma* Windhan que comprende 16 especies en total ⁽²⁷⁾, como se encuentra registrado en The Plant List 2013 ⁽²⁸⁾. Roersch ⁽¹⁵⁾ en su estudio de plantas medicinales del sur andino del Perú reportó a inca sayre como hipoglucemiante, al consumirlo como infusión. Del mismo modo, Szeliga ⁽¹⁴⁾ al referirse a las plantas peruanas con propiedades medicinales indicó que inca sayre se usaba en el tratamiento de diabetes mellitus. Los pacientes andinos hacían hervir la cuarta parte del helecho en medio litro de

agua por 10 minutos, tomando en ayunas por la mañana y noche. Así mismo, Wollenweber y Scheneidem ⁽²⁹⁾ describieron que la parte verde de la planta de *Notholaena nivea* sudamericana presentaba efecto hipoglucemiante al emplearse en infusión o tisana. En otro estudio, Castañeda *et al.* ⁽³⁰⁾ mostraron que el atomizado de Cuti-Cuti presentó abundante cantidad de catequinas, resinas y antocianinas, y observaron presencia de principios hipoglucemiantes frente a hiperglucemia experimental en ratas. Además, resaltaron que los metabolitos secundarios de las plantas dependen de factores del ecosistema como luz, calor, altitud, temperatura, entre otros, y los metabolitos varían de acuerdo al lugar y a la estación del año en que se recolecten. También, evaluaron en *Notholaena nivea* Desv. la actividad antioxidante de cuatro derivados de bibencilos aislados de la parte aérea y reportaron que el metoxibencilo-5-dihidroxi-12,3 fue el compuesto más activo en la eliminación de radicales libres con actividad antioxidante. Además, de estos derivados bibencilos obtuvieron seis bis-bibencilos con actividad antioxidante, y podrían presentar actividad antiinflamatoria y anticancerígena ⁽³¹⁾.

En el presente trabajo se realizó la evaluación preclínica y clínica de la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre en diabetes tipo 2. Para ello, se determinó la toxicidad aguda del extracto de las partes aéreas en ratones, así como la dosis efectiva del extracto y evaluación de la actividad hipoglucemiante en ratas con diabetes experimental y normoglucémicas. Finalmente, se evaluó clínicamente en voluntarios normoglucémicos y pacientes diabéticos tipo 2.

Recolección y preparación del extracto de inca sayre

La parte aérea de *Argyroschisma nivea* (Poir.) Windham fue recolectada en Saccsayhuaman, a 2 Km de la ciudad de Cusco (Perú), a 3400 m de altitud. La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Vargas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Tras lavarlos, el material vegetal fue desecado a la sombra, a temperatura ambiente, por 20 días, pulverizado (tamaño de partícula de 250 µm) y conservado en frascos ámbar a 4 °C.

El extracto hidroalcohólico seco de inca sayre se obtuvo por maceración de la parte aérea pulverizada con etanol al 70% en proporción 1:10 (p/v) por 10 días. Tras filtración, el líquido obtenido se concentró por evaporación en un baño isotérmico hasta sequedad a 37 °C con agitación constante, y se almacenó a 4 °C. Se obtuvo una proporción final de droga:extracto seco de 4:1 (p/p). Las características organo-

lépticas del extracto seco fueron: color amarillo verdusco, olor sui géneris, aspecto homogéneo, con sabor amargo.

Análisis estadístico

Tanto en el estudio preclínico como en el clínico, el análisis estadístico se realizó con el programa STATA versión 11,0 (Stata Corp LP, Collee Station, Texas). Para el análisis diferencial de medias se utilizó chi cuadrado y ANOVA con pruebas post-hoc. Se consideró un intervalo de confianza al 95% y a todo valor de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron realizados por triplicado, se expresó como la media (μ) \pm error estándar de la muestra (SEM).

Evaluación preclínica

Resultados

Determinación de la toxicidad aguda del extracto de inca sayre

Se empleó ratones machos albinos consanguíneos cepa *Balb C-53*, sanos con peso promedio de 25 g, de 2 a 3 meses de edad; provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima (Perú). Estuvieron en un bioterio a temperatura de 22 a 24 °C, con fotoperiodos de 12 h de luz/oscuridad y libre acceso a agua y alimento, de acuerdo a lo establecido en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH, 2011) ⁽³³⁾.

Se evaluaron 10 grupos de seis ratones. A 9 de estos grupos se les administró por vía intragástrica diferentes dosis del extracto de inca sayre en 500, 1.000, 3.000, 5.000, 7.000, 9.000, 11.000, 13.000 y 15.000 mg/Kg, disueltos en solución fisiológica (NaCl 0,9%). Además, al grupo control se le administró sólo solución fisiológica (NaCl 0,9%). Después de transcurrir 12 h de la administración de las dosis, los ratones recibieron sus alimentos y agua de forma habitual. Las observaciones del comportamiento autonómico y neurológico de los ratones se realizaron cada 2 horas durante el primer día, luego cada 8 h hasta el séptimo día. La administración del extracto de inca sayre hasta la dosis límite de 15.000 mg/Kg durante siete días no produjo muerte de los ratones. Sin embargo, se observó en los ratones disminución de la actividad motora, signo de cola de Straub e hiperventilación a partir de la dosis de 9.000 a 15.000 mg/Kg, lo cual indicó que la dosis letal media (DL_{50}) sería mayor a 15.000 mg/Kg.

Evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre

Se empleó ratas machos albinos consanguíneos cepa *Holtzmann*, sanos con peso promedio de 250 g, de 3 a 4 meses de edad; provenientes del INS y estuvieron en las mismas condiciones mencionadas en los ratones.

Inducción de diabetes experimental

Se indujo diabetes experimental con la administración de 112 mg/Kg de aloxano por vía intraperitoneal. A las 48 h se evaluó la hiperglucemia. El primer día de diabetes experimental se evaluó el nivel de glucemia cada 2 h, los doce días restantes se realizó una sola vez por día. En condiciones normales las ratas registraron niveles de glucemia entre 93,5 y 102,0 mg/dL, se consideró ratas diabéticas aquellas con niveles de glucemia mayor o igual a 150 mg/dL.

Determinación del nivel de glucemia

La toma de muestra de sangre en la determinación de la dosis efectiva y en la evaluación de la actividad hipoglucemiante se realizó por un periodo de trece días, con una sola extracción de sangre por día. En la determinación de los niveles de glucemia, se tomó las muestras de sangre basal de la vena caudal lateral de la cola de las ratas, en tubos capilares heparinizados. Se analizó los niveles de glucemia por el método enzimático colorimétrico de glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD-POD) descrito por Sang-Eun *et al.* (33).

Determinación de la dosis efectiva del extracto

Se formaron 3 grupos de ratas (n=6). A un grupo se administró por vía intragástrica la dosis de 100 mg/Kg del extracto de inca sayre, a otro grupo 150 mg/Kg, y al grupo control solución fisiológica (NaCl 0,9%).

En el primer día de diabetes experimental los tres grupos de ratas presentaron incremento significativo de los niveles de glucemia, hasta 497,8 mg/dL en la sexta hora. Al administrarles las diferentes dosis del extracto de inca sayre y la solución fisiológica, se observó que la dosis de 150 mg/Kg del extracto produjo mayor descenso del promedio de glucemia en comparación a 100 mg/Kg y al grupo control ($p \leq 0,05$), durante los trece días de evaluación. Siendo el onceavo y treceavo día los de mayor significancia, con niveles cercanos a glucemia normal (FIGURA 3). Por lo tanto, se consideró la dosis de 150 mg/Kg del extracto de inca sayre como óptima para ser empleada en las evaluaciones posteriores.

Evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto en ratas diabéticas y normoglucémicas

Se formó 4 grupos de ratas (n=6). Al grupo A formado por ratas inducidas a diabetes experimental (hiperglucémicas) y grupo B formado por ratas sanas normoglucémicas, se les administró 150 mg/Kg del extracto de inca sayre. Al grupo C formado por ratas hiperglucémicas y grupo D formado por ratas normoglucémicas, se les administró solución fisiológica (NaCl 0,9%); durante trece días de tratamiento.

El grupo A presentó el primer día el promedio elevado de glucemia de $471,7 \pm 0,1$ mg/dL, que disminuyó significativamente hasta obtener valores cercanos a la normoglucemia ($85,4 \pm 0,1$ mg/dL) en el treceavo día; la mayor disminución de glucemia se observó los días once y trece ($p \leq 0,05$). El grupo B mostró ligero descenso en los niveles de glucemia, con promedio entre $92,8 \pm 0,2$ y $94,1 \pm 0,2$ mg/dL. Mientras, el grupo C mostró valores de glucemia extremos el primer día ($497,8$ mg/dL) y valores de hiperglucemia durante todo el experimento hasta el final (152 mg/dL), se apreció de esta manera la hiperglucemia aloxánica. Como se esperaba, el grupo D tuvo niveles normales y constantes de glucemia durante todo el estudio, debido a que eran normoglicémicas y sólo recibieron solución fisiológica. Por lo tanto, la administración intragástrica del extracto de inca sayre con la dosis de 150 mg/Kg cada 24 h durante trece días presentó actividad hipoglucemiante significativa en ratas diabéticas, y ligero descenso de glucemia en ratas normoglucémicas (FIGURA 4).

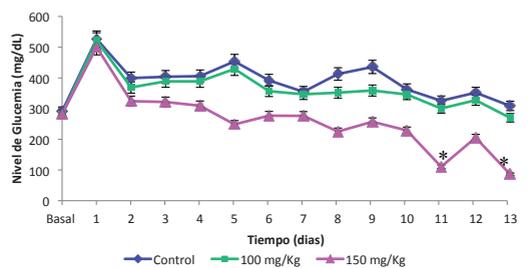


FIGURA 3. Niveles de glucemia de ratas inducidas a diabetes experimental al administrarles por vía intragástrica el extracto de inca sayre en diferentes dosis durante trece días. La dosis de 150 mg/Kg disminuyó la glucemia significativamente durante la mayor parte del tiempo, siendo los días once y trece los de mayor significancia. Cada punto representa el promedio \pm SEM de seis ratas, * $p \leq 0,05$.

Evaluación clínica

Métodos

Participaron voluntarios sanos (normoglucémicos) y pacientes con diabetes tipo 2, provenientes del Hospital Antonio Lorena del Cusco (Perú). Esta evaluación se desarrolló con la autorización voluntaria de los mismos participantes, que firmaron el consentimiento informado, la aprobación del Comité Ético del Hospital, y el monitoreo permanente del endocrinólogo del hospital. El tamaño de muestra se determinó con la fórmula de proporción poblacional reportada por Mormontoy *et al.* ⁽³⁴⁾.

Criterios de selección

Voluntarios normoglucémicos. Se incluyeron personas sanas entre 20 a 65 años de edad, con niveles de glucemia normal en ayunas < 100 mg/dL, y niveles de glucemia postprandial < 140 mg/dL ⁽³⁵⁾, Índice de Masa Corporal (IMC) < 30 Kg/m², y presión arterial de 120/80 mmHg óptimo según criterios de la OPS/OMS ⁽³⁶⁾. Se excluyeron enfermos y los que no firmaron el consentimiento informado.

Pacientes diabéticos. Se incluyeron pacientes con diabetes mellitus tipo 2 entre 40 a 65 años de edad, con tiempo de enfermedad menor a 10 años, IMC menor a 30 Kg/m² y que estuvieran en tratamiento con antidiabéticos orales. Se excluyeron pacientes con complicaciones crónicas severas por diabetes como retinopatía, nefropatía y neuropatía diabéticas con complicaciones agudas como enfermedad coronaria e hipertensión arterial moderada o severa, pacientes con riesgo de suspender el tratamiento, y los que no firmaron el consentimiento informado.

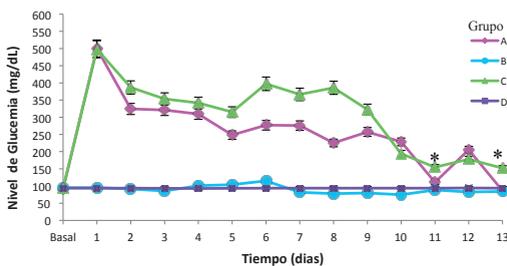


FIGURA 4. Niveles de glucemia de ratas hiperglucémicas (Grupo A) y normoglucémicas (Grupo B) al administrarles por vía intragástrica el tratamiento 150 mg/Kg del extracto de inca sayre, y en ratas hiperglucémicas (Grupo C) y normoglucémicas (Grupo D) al administrarles solución fisiológica, durante trece días. Cada punto representa el promedio \pm SEM de 6 ratas, * $p \leq 0,05$.

Evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre

Se suspendió el tratamiento de antidiabéticos orales a los pacientes diabéticos tipo 2 y fue remplazado por placebo durante tres días. Luego, a los voluntarios normoglucémicos y diabéticos tipo 2 se les administró por vía oral una dosis de 2 g cada 12 h del extracto seco encapsulado de inca sayre por un periodo de siete días, en ayunas con abundante agua.

Determinación del nivel de glucemia

La toma de muestra de sangre venosa se realizó el último día del tratamiento con antidiabéticos orales y de la toma de placebo, así como los días 1, 3, 5 y 7 de tratamiento con el extracto de inca sayre. De las muestras sanguíneas se obtuvo el suero y se determinó los niveles de glucemia por el método enzimático (GOD-POD) ⁽³³⁾.

Prueba de tolerancia oral a la glucosa adaptada (PTOGA)

Se realizó para determinar los niveles de glucemia postprandial de los pacientes diabéticos tipo 2. La toma de muestra de sangre se obtuvo el último día del tratamiento con antidiabéticos orales, placebo y del extracto. Para lo cual, los pacientes estuvieron 12 h en ayunas y con interrupción de tratamiento. Luego, 120 minutos después de ingerir una carga de glucosa (0,25 g/mL) en jugo de naranja, se les midió los niveles de glucemia.

Resultados

El tamaño de muestra calculado para la población de diabetes de tipo 2 en Cusco mostró que como mínimo se debía realizar el estudio clínico con cuatro pacientes.

Evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre

En voluntarios normoglucémicos, se observó el promedio de glucemia basal de $86,16 \pm 3,4$ mg/dL, después de una semana de tratamiento con el extracto disminuyó a $75,62 \pm 2,4$ mg/dL ($p \leq 0,05$), se mostró el primer día el promedio más bajo del nivel de glucemia obtenido durante el tratamiento ($59,6 \pm 1,8$ mg/dL). De esta manera, el extracto de inca sayre al finalizar el tratamiento redujo en 11% los niveles de glucemia en comparación al nivel basal ($p \leq 0,05$) (TABLA 1).

En pacientes diabéticos de tipo 2, el promedio de glucemia fue de $133,5 \pm 9,3$ mg/dL con el tratamiento con antidiabéticos orales. Al administrarles el placebo se incrementó a $154,0 \pm 7,9$ mg/dL. Luego, al administrarles el extracto

	Glucemia
Basal	86,16 mg/dL ± 3,4
Día 1	59,58 mg/dL ± 1,8*
Día 3	67,35 mg/dL ± 2,5*
Día 5	79,92 mg/dL ± 2,5*
Día 7	75,62 mg/dL ± 2,4*

TABLA 1. Niveles de glucemia en 10 voluntarios normoglucémicos antes del tratamiento y al administrarles por vía oral 2 g cada 12 h del extracto de inca sayre durante siete días. Los valores se expresan en forma de promedio ± SEM. * $p \leq 0,05$.

de inca sayre se observó una ligera disminución el primer día a 151,0 ± 7,9 mg/dL, que pasó a 121,4 ± 19,1 mg/dL el tercer día, con una reducción significativa del 9,0% y el 21,2% respecto a los valores registrados en el tratamiento con antidiabéticos orales y placebo, respectivamente ($p \leq 0,05$). El quinto día los niveles de glucemia fueron 122,6 ± 5,8 mg/dL (disminución del 8,2% y 20,4%, respectivamente, $p \leq 0,05$) y el séptimo día fue de 125,3 ± 6,7 mg/dL (diminución del 6,2% y 18,6%, respectivamente, $p \leq 0,05$). Además, en la PTOGA en pacientes con diabetes tipo 2 tratados con antidiabéticos orales el promedio del nivel de glucemia a los 120 minutos fue de 189,2 mg/dL, de 228,8 mg/dL en los tratados con placebo y de 178,0 mg/dL en los tratados con el extracto, siendo significativamente menor el incremento con este último (FIGURA 5).

En conclusión, la administración oral del extracto encapsulado de inca sayre con la dosis de 2 g cada 12 h durante siete días presentó actividad hipoglucemiante en voluntarios normoglucémicos y pacientes diabéticos tipo 2, con mayor control metabólico en los niveles de glucemia después de la PTOGA.

Discusión

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica con incidencia creciente que afecta a todo el mundo, convirtiéndose en prioridad de salud pública, por lo que los organismos mundiales como OMS y OPS recomiendan el estudio integral de la etnomedicina como alternativa natural en diferentes enfermedades incluyendo a diabetes tipo 2.

Se conoce que los responsables de los efectos biológicos y farmacológicos de plantas medicinales son grupos de

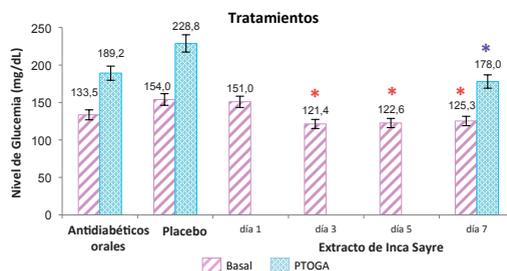


FIGURA 5. Niveles de glucemia basal y PTOGA de pacientes diabéticos tipo 2 al administrarles por vía oral 2 g cada 12 h extracto de inca sayre durante siete días, en comparación al tratamiento con antidiabéticos orales y placebo. Cada punto representa el promedio ± SEM de 10 pacientes. * $p \leq 0,05$.

sustancias o principios activos, con diferente composición química, que al interaccionar con el organismo humano o animal liberan la actividad farmacológica y posibles efectos tóxicos (37, 38). En el presente estudio el análisis fitoquímico preliminar del extracto de inca sayre mostró metabolitos en abundante y moderada cantidad: esteroides y triterpenoides, lactonas, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, y glucósidos; y en poca cantidad azúcares reductores. La actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre se relaciona con la interacción sinérgica de estos metabolitos. De manera similar, Castañeda *et al.* (30) reportaron abundante cantidad de catequinas, resinas y antocianinas; moderada cantidad de grasas y aceites, fenoles y taninos, flavonoides; y poca cantidad de alcaloides, lactonas y cumarinas, azúcares reductores, saponinas de tipo esterooidal y triterpenoides, y principios amargos. En algunos estudios reportaron que la acción hipoglucemiante de algunas plantas se debe a la presencia de glucósidos que inhiben a la enzima aldosa reductasa o alditol, la cual transforma la glucosa en sorbitol en la vía de los polioles que ocasiona la hiperglicemia (39). También, algunos extractos que contienen flavonoides ejercen efecto hipoglucemiante, a través de la enzima α -glucosidasa que favorece la fosforilación de la glucosa para formar glucosa-6-fosfato, y este sería el paso limitante para la glucólisis y la regulación de la glucosa sanguínea (40).

En la evaluación preclínica, los resultados de toxicidad aguda del extracto de inca sayre mostraron que el extracto administrado por vía oral no ocasionó la muerte de algún ratón con la dosis límite. Por lo tanto, la DL_{50} del extracto de inca sayre sería mayor a 15.000 mg/Kg. Lo cual, indicó



FIGURA 6. Inca sayre mostrando su superficie abaxial. Foto: Álvaro Paredes (www.sunaperu.com).

que la planta prácticamente no es tóxica según los criterios de Williams. Resultados similares se observaron en el trabajo de Castañeda *et al.* ⁽³⁰⁾ quienes reportaron ausencia de toxicidad aguda en ratones del atomizado del extracto etanólico de *Notholaena nivea* (cuti-cuti), con una DL_{50} del atomizado de 10.971,26 mg/Kg.

En la evaluación de la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre, las ratas inducidas a diabetes experimental con aloxano (produce un daño selectivo sobre las células beta pancreáticas) mostraron niveles elevados de glucemia los primeros días y mostraron hiperglucemia durante todo el estudio. Además, presentaron síntomas clásicos de diabetes como polidipsia (aumento de sed), polifagia (aumento de apetito), poliuria (aumento de orina) y pérdida de peso. En la investigación de Eid *et al.* ⁽⁴⁰⁾ describieron que los descensos de peso corporal y el adelgazamiento de los animales aloxanizados se produce por la pérdida acuosa consecutiva a la glucosuria y al catabolismo tisular por la necesidad de obtener otras fuentes de energía. Así, indican que el aloxano posee una estructura

molecular similar a la glucosa, y es captado por las células beta por la vía de transporte glucosa GLUT-2, y genera radicales hidroxilo, de esta manera se origina la toxicidad y diabetes en ratas ⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

En la determinación de la dosis efectiva del extracto, 150 mg/Kg del extracto de inca sayre obtuvo mayor disminución de los niveles de glucemia en ratas con diabetes experimental en comparación a 100 mg/Kg y al grupo control ($p \leq 0,05$). Así mismo, la administración de 150 mg/Kg del extracto cada 24 h durante trece días mostró en las ratas diabéticas (Grupo A) disminución significativa de glucemia, con reducción del 82,0% del primer día (471,7 mg/dL) al treceavo día de tratamiento (85,4 mg/dL). Sin embargo, en ratas normoglucémicas (Grupo B) hubo ligera disminución de glucemia en comparación a las tratadas sólo con solución fisiológica (Grupos C y D). Así, se evidenció la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre en ratas diabéticas y ligera disminución en normoglucémicas. Castañeda *et al.* ⁽³⁰⁾ describieron actividad hipoglucemiante en ratas inducida a diabetes experimental por aloxano al emplear el atomizado y pool de alcaloides-250 de *Notholaena nivea* (cuti-cuti), concluyendo que tanto el atomizado como los alcaloides presentaron disminución significativa de los niveles de glucemia.

En la evaluación clínica del extracto de inca sayre, una dosis de 2 g cada 12 h durante siete días del extracto seco encapsulado de inca sayre mostró en los voluntarios normoglucémicos una disminución de aproximadamente un 11% en los niveles de glucemia en comparación al basal ($p \leq 0,05$). De la misma manera, en los pacientes diabéticos tipo 2 que recibieron el tratamiento del extracto de inca sayre se observó disminución del promedio del nivel de glucemia de 9,0%, 8,2% y 6,2% el tercer, quinto y séptimo día, respectivamente, en comparación al promedio del nivel de glucemia observado en el tratamiento con antidiabéticos orales ($p \leq 0,05$) y 21,2%, 20,4% y 18,6% el tercer, quinto y séptimo día, respectivamente, en comparación al promedio del nivel de glucemia observado en el placebo ($p \leq 0,05$). También, se mostró con la administración del extracto de inca sayre después de la PTOGA que sólo se incrementó la glucemia en 52,7 mg/dL, promedio similar al obtenido con el tratamiento con antidiabéticos orales y menor al placebo ($p \leq 0,05$). Por lo tanto, el extracto de inca sayre presentó actividad hipoglucemiante en voluntarios normoglucémicos y pacientes diabéticos tipo 2, por presentar mayor disminución significativa en los niveles de glucemia en comparación al tratamiento con antidiabéticos orales y placebo ($p \leq 0,05$). Además, presentó mayor control metabólico de los niveles de glucemia después de la PTOGA.

En revisión bibliográfica no se encontraron otros estudios clínicos con inca sayre o con otras Pteridáceas. Sin embargo, se encontró que las principales familias antidiabéticas objeto de ensayos clínicos fueron las Aliáceas, Fabáceas, Aloáceas, Esterculiáceas, Lauráceas, Zingiberáceas, Asclepiadáceas, Aquifoliáceas, Cucurbitáceas, Juglandáceas, Lamiáceas y Teáceas^(11, 44). Dick *et al.*⁽⁴⁵⁾ valoraron por metaanálisis la eficacia de la administración oral de áloe vera (sábila) en la reducción de glucemia en pacientes diabéticos. En la misma planta, evaluaron el extracto de fracciones de elevado peso molecular en 15 pacientes diabéticos durante seis semanas observaron disminución significativa de glucemia sanguínea⁽⁴⁶⁾. En el año 2010 Wickenberg *et al.*⁽⁴⁷⁾ evaluaron en 14 pacientes sanos el efecto de rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) y describieron que 6 g del extracto, en 15 y 30 minutos, incrementó la insulina postprandial sin afectar a la glucemia basal, e indicaron que presentó efecto sobre la secreción de insulina.

Es importante, conocer de las especies fitoterápicas varios aspectos como los saberes ancestrales, la etnobotánica, la etnofarmacología, la actividad biológica, entre otros. Para evidenciar mediante farmacología experimental a través de ensayos preclínicos y clínicos, su potencial fitoterapéutico⁽⁴⁸⁾. De esta manera, se podrán establecer límites y posibilidades de la actividad terapéutica, como también sus posibles efectos nocivos o tóxicos, y al tener las bases científicas se fomentará su uso racional⁽⁴⁹⁾.

Conclusiones

La ausencia de toxicidad y disminución significativa de los niveles de glucemia en la evaluación preclínica y clínica (voluntarios normoglicémicos y pacientes diabéticos tipo 2), mostró la actividad hipoglucemiante del extracto de inca sayre con la dosis de 150 mg/Kg cada 24 h en la evaluación preclínica, y 2 g cada 12 h en la evaluación clínica. Por lo tanto, el extracto de inca sayre podría ser una alternativa natural para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 con adecuado control metabólico en los niveles de glucemia después de la prueba de tolerancia oral a la glucosa.

Agradecimientos

Agradecemos a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (Perú) por facilitar sus laboratorios y equipamiento, Departamento de Endocrinología del Hospital Antonio Lorena del Cusco (Perú). Voluntarios sanos y pacientes diabéticos tipo 2 que participaron en el presente estudio.

Por las fotografías de inca sayre a Alvaro Paredes, Sunaq Perú Private Tours, www.sunaqperu.com.

Referencias bibliográficas

1. International Diabetes Federation, Executive summary IDF Diabetes Atlas, 7th Edition, Brussels Belgium, 2015.
2. Shaw J, Sicre R, Zimmet P. Global estimates for the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 4-14.
3. King H, Aubert R, Herman W. Global burden of diabetes 1995-2025. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
4. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: Estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 15-19.
5. Klonoff DC, Schwartz DM. An economic analysis of interventions for diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 390-404.
6. WHO. Organización mundial de la salud. Perfiles de los países para la diabetes, 2016. http://www.who.int/diabetes/country-profiles/per_es.pdf.
7. Sandoval, M. Importancia global y local de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Hosp Vlin Univ Chile* 2012; 23: 185-190.
8. Nolan CH, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 2011; 378: 169-81.
9. Stumvoll M, Goldstein B, Van Haeften T. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; 365: 1333-1346.
10. Tam Z, Ng S, Tan L, Lin CH, Rothenbacher D, Klenk J, et al. Metabolite profiling in identifying metabolic biomarkers in older people with late-onset type 2 diabetes mellitus. *Scientific Reports* 2017; 7(1) 4392: 1-12.
11. Rios JL, Grancini F, Schinella G. Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (I): Mecanismo de acción. *Rev Fitoter* 2016; 16 (1): 17-31.
12. Fernández B. Industria farmacéutica, catálogo de plantas medicinales pp. 19-20. Lima: Universidad de Lima, 1994.
13. Palacios J. Plantas medicinales nativas del Perú. Vol 1, pp 12-14. Perú: CONCYTEC, 1993.
14. Szeliga E. Plantas con propiedades medicinales. Cusco, Perú: Centro de medicina andina, 1995.
15. Roersch, C. Plantas medicinales en el sur andino del Perú. Vol 2. Cusco, Perú: Centro de medicina andina -Koeltz Scientific Books; 1994.
16. Yacovieff P, Herrera F. Botánica etiológica. El mundo vegetal de los antiguos peruanos. Lima, Perú: Revista del Museo Nacional, 1960.
17. Gacete F. New genetic classification. Kew botanical gardens pp. 60-63. Inglaterra: Jeremy, 1987.
18. Rodríguez R. Pteridophyta. En: Marticorena C, Rodríguez R (Eds). Flora de Chile, Pteridophyta: Gymnospermae vol. 1, pp.119-309. Concepción, Chile: Universidad de Concepción, 1995.
19. Tryon R, Stolze R. Pteridophyta of Perú. Part II. Chicago, USA: Fieldiana botany, 1989.
20. Meyer BS, Banderson D, Bohning RH, Fratiante DG. Introduction to Plant Physiology. New York: D. Van Nostrand Company, 1973.

21. Avendaño A. Medicina popular quechua. La rebelión de los Malkus. 2 ed. Lima, Perú: Antawara, 2000.
22. Herrera F. Contribución al conocimiento de la flora del Cusco. Rev Museo Natur 1940; 2: 73-80.
23. Urrunaga R. Plantas medicinales de la farmacopea popular del departamento del Cusco. Cusco, Perú: Universitaria UNSAAC, 1989.
24. Wollenweber E, Doerr M, Waton H, Favre-Bonvin J. Flavonoid aglycones and dihydrostilbene from the frond exudate of *Notholaena nivea*. *Phytochem* 1993; 33(3): 611-612.
25. Tryon R. A revision of the American species of *Notholaena*, Contributions of the Gray Herbarium 1956; 179: 1-106.
26. Wollenweber E. Flavones and flavonols. In Harbone JB, Mabry T J (Eds): *Flavonoids, advances in research Vol 2*, 189. London: Chapman and Hall, 1982.
27. Windham MD. *Argyrochosma* a new genus of Cheilantheid ferns. *Amer Fern* 1987; 77(2): 37-41.
28. The Plant List 2013. <http://www.theplantlist.org>
29. Wollenweber E, Schneidem H. Lipophilic exudates of Pteridaceae-chemistry and chemotaxonomic. *Biochem System Ecol* 2000; 28(1): 751-777.
30. Castañeda B, Castro R, Manrique R, Ibañez L, Fujita R, Barnett, et al. Estudio fitoquímico y farmacológico de 4 plantas con efecto hipoglucemiante. *Horiz Médic* 2008; 8(1): 6-34.
31. Giuseppina C, Montoro P, Lock De Ugaz O, Vassallo A, Severino L, Pizza C, et al. Antioxidant bibenzyl derivatives from *Notholaena nivea* Desv. *Molecul* 2011; 16: 2527-2541.
32. NIH. National Institutes of Health, Guide for the care and use of laboratory animals, 8 ed. N 85-23, The National Academy Press, USA, 2011.
33. Sang-Eun P, Mee-Hyun C, Jin-Kyu L, Jong-Sang K, Jeong-Hwan K, Dae YK, et al. A New Colorimetric Method for Determining the Isomerization Activity of Sucrose Isomerase. *Bioscience Biotech Bioch* 2007; 71: 583-586.
34. Mormontoy W, Medina MC, Mormontoy HN. Prácticas de bioestadística. 1 ed. Lima: USMP Facultad de Medicina humana; 2013.
35. ALAD. Journal of ALAD, Latin American Association of Diabetes. ALAD guidelines on diagnosis, control and treatment of type 2 diabetes mellitus with evidence-based medicine. Edition 2013.
36. PAHO/WHO. Control of arterial hypertension. Washington. DC: PAHO/WHO, 2015.
37. Zang X. Traditional Medicine WHO. *Hardard Medicus* 1996; 39 (3): 1-103.
38. Brundtland G. Access to essential medicines: a global necessity. In: World Health Organization (Eds.) *Essential drugs monitor* 32: 12-13. Geneva: WHO, 2003.
39. Castañeda B, Castro R, Puebla P, Ibañez L. Efecto del extracto atomizado de las hojas de *Calophyllum brasiliense* (lagarto caspi) sobre glicemia. *Rev Horiz Medic* 2011; 11(1): 7-14.
40. Eid H, Martineau L, Saleem A, Muhammad A, Vallerand D, Benhaddou-Andaloussi A, et al. Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *vaccinium vitis-idaea*. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(7): 991-1003.
41. Justil C, Angulo P, Justil H, Arrollo J. Evaluation of the hypoglycemic activity of the aqueous extract of *Abuta grandifolia* (Mart.) in rats with diabetes induced by aloxano. *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(2): 206-212.
42. Cubillos V, Lopez C, Alberdi A. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de pancreas en perros diabéticos inducidos con aloxano. *Arch Med Vet* 2008; 40: 169-177.
43. Ojewole J. Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* Hook (Willd) methanolic root extract in rats. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 231-237.
44. Rios JL, Schinella G, Francini F. Drogas vegetales para el tratamiento de la diabetes (II): ensayos clínicos. *Rev Fitoter* 2016; 16 (2): 101-121.
45. Dick WR, Fletcher EA, Shah SA. Reduction of fasting blood glucose and hemoglobin A1c using oral Aloe vera: a meta-analysis. *J Altern Complement Med* 2016; 22: 450-457.
46. Akira Y, Sahar H, Amal K, Engy A. Possible hypoglucemiant effect of Aloe vera L. high molecular weight fractions on type 2 diabetic patients. *J Saudi Pharm* 2009; 17(3): 210-218.
47. Wickenberg J, Ingemansson SL, Hlebowicz J. Effects of *Curcuma longa* (turmeric) on postprandial plasma glucose and insulin in healthy subjects. *Nutr J* 2010; 9:43.
48. WHO. World Health Organization. General guidelines for methodologies for research and evaluation of traditional medicine. Ginebra 2002; WHO: 1.
49. Giner E, Castillo E. Fitoterapia y diabetes. *Rev Fitoter* 2003; 3(2): 113-122.