

## Evaluación del efecto hipoglucemiante de *Gentianella bicolor* (Corpus huay), *Gentianella nitida* (Hercampuri) y *Gentianella chamuchui* (Genciana) en *Rattus rattus*

Ludisleydis Bermúdez Díaz <sup>1</sup>, Jorge J. Huamán Saavedra <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú, lbermudezd1@upao.edu.pe;

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú, jjhuamans@gmail.com

Recibido:11-03-2015

Aceptado: 04-05-2015

### RESUMEN

La medicina tradicional peruana ha empleado desde tiempos remotos a especies de la familia *Gentianaceae* para el tratamiento de Diabetes mellitus. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto hipoglucemiante de extractos obtenidos a partir de *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle, *Gentianella nitida* y *Gentianella chamuchui* en *Rattus rattus*. Se conformaron 05 grupos de experimentación de 07 animales cada uno; el grupo 01 estuvo conformado por ratas sanas y el resto de los grupos estuvo conformado por ratas con diabetes inducida con una inyección intraperitoneal de Estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg). Un grupo de ratas diabéticas fue tomado como control positivo y al resto de los grupos se le administró una dosis diaria de 500 mg/kg de peso del extracto acuoso obtenido a partir de *Gentianella bicolor*, *Gentianella nitida* y *Gentianella chamuchui* respectivamente, durante 21 días. Se colectaron muestras de sangre por incisión en la cola de los animales de experimentación y se determinó los niveles de glucemia a las: 03, 06 y 24 horas después de la administración oral de los extractos acuosos de cada planta. Durante los primeros 13 días no se observó disminución estadísticamente significativa de las glucemias de los animales de experimentación después de la administración de los extractos de las plantas en ninguno de los grupos de experimentación. A partir del día 14, se observó una disminución de la glucemia estadísticamente significativa, principalmente en el grupo al que se le administró el extracto acuoso obtenido a partir de *Gentianella bicolor* (de 435 mg/dL a 341.9 mg/dL de glucemia), a las 06 horas después de administrado el extracto. Se corroboró el efecto hipoglucemiante de las especies de la familia *Gentianaceae* empleadas en el estudio, observándose un efecto hipoglucemiante a largo plazo alrededor del 40% con la administración del extracto acuoso de *Gentianella bicolor*.

**Palabras clave:** Diabetes mellitus, *Gentianella bicolor*, *Gentianella nitida*, *Gentianella chamuchui*, efecto hipoglucemiante.

### ABSTRACT

Traditional Peruvian medicine has been used since ancient times to family *Gentianaceae* species for treating Diabetes mellitus. The aim of this study is to compare the hypoglycaemic effect of aqueous extracts obtained from *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex JS Pringle, *Gentianella nitida* and *Gentianella chamuchui* in *Rattus rattus*. Rats were divided into five experimental groups (healthy rats as a control group, untreated STZ-diabetic (60 mg/kg B.W., IP), treated STZ-diabetic with aqueous extract of *Gentianella bicolor* (500 mg/kg B.W.), treated STZ-diabetic with aqueous extract of *Gentianella nitida* (500 mg/kg B.W.) and treated STZ-diabetic with aqueous extract of *Gentianella chamuchui* (500 mg/kg B.W.) and were evaluated for 21 days. Blood samples

were collected by tail incision and blood glucose levels were measured at: 03, 06 and 24 hours after oral administration of aqueous extracts from each plant. During the first 13 days, the blood glucose levels not decreased significantly in any group of experimentation. From day 14, the blood glucose levels was reduced significantly when compared to the control group, particularly in treated STZ-diabetic with aqueous extract of *Gentianella bicolor* group (435 mg/ dL to 341.9 mg / dL glycemia) was observed to 06 hours after administration of the extract. The hypoglycaemic effect of *Gentianaceae* family species used in the study was confirmed, showing a long-term blood glucose lowering effect about 40% with administration of aqueous extract of *Gentianella bicolor*.

**Keywords:** Diabetes mellitus, *Gentianella bicolor*, *Gentianella nitida*, *Gentianella chamuchui*, hypoglycaemic effect.

## I. INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que para el año 2025 el 5,4 % de la población mundial padecerá Diabetes mellitus, cifra que alcanzará los 336 millones de enfermos para el año 2030, siendo Latinoamérica el tercer lugar con mayor prevalencia en esta enfermedad (Ke-wei, 2013: 3). La medicina tradicional ofrece una alternativa para el tratamiento de padecimientos como la Diabetes mellitus en los que actualmente son utilizados una gran variedad de plantas y derivados de estas como el aguacate, ajo, té verde, goma guar, espirulina, plantas pertenecientes a la familia de las *Leguminaceae*, *Curcubitaceae*, *Dioscoreaceae*, entre otras (Der Marderossian, 2008: 23; Apijade, 2006: 4; Pérez, 2002: 2).

En los últimos años se han patentado algunos compuestos a partir de plantas medicinales a los que se les ha demostrado su efecto hipoglucemiante entre los que se encuentran: terpenoides tipo quinonas (Sadashiv, 2009: 3), sesquiterpenoides (furanoteremophilano y eremophilanolido). Alcaloides tales como cryptolepina y quindolina y triterpenoides. Además se han patentado flavonoides glicosidados (Wayne, 1997: 5), polifenoles (Zabeer, 2004: 2) y una proteína con actividad antidiabética (Patell, 2008: 6). A muchos de estos compuestos no se les ha podido establecer aún sus mecanismos de acción, ya que son moléculas complejas. Las especies de la familia *Gentianaceae* como la *Gentianella umbellata* y *Gentianella gramínea*, presentan fitoconstituyentes como flavonoides, peptinas, saponinas, triterpenos a los que se les atribuye el efecto hipoglucemiante (Brako y Zaruchi, 1993: 210; Salazar, 2011: 11).

*Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle, conocida comúnmente como: “corpus huay”, “campanilla”, “shashacuma”, “campanilla morada”, es una planta que crece entre los 3000 y 4500 m.s.n.m., que se ha reportado en la región de La Libertad y Cajamarca en Perú y también en Bolivia (Mostacero et al., 2011). Entre sus usos etnomedicinales destacan su empleo como antianémico, antidiabético, antipirético, purificador de la sangre y para trastornos hepáticos (León et al., 2006: 54). También se le ha reportado efecto hipocolesterolémico (Brako y Zaruchi, 1993: 98) y se ha empleado en el tratamiento de la gastritis, artritis, diabetes y reumatismo (Salazar, 2011: 23; Becerra, 1991: 45).

La *Gentianella nitida*, conocida comúnmente como “hercampuri”, es una especie endémica del Perú que se ha reportado entre los 3500 y 4500 m.s.n.m. en las regiones de La Libertad, Junín y Huánuco. El extracto acuoso de la planta entera ha sido empleado dentro de la etnomedicina peruana como un remedio para las afecciones hepáticas, vesiculares y pancreáticas, como colagogo y digestivo, para el tratamiento de la obesidad por su acción hipocolesterolémica y además es utilizada como regulador del metabolismo (Bussmann y Glenn, 2010: 6; Bussmann et al., 2010: 9), antidiabética, diurética, y para prevenir la formación de los cálculos biliares (Bussmann et al., 2010: 4; Bussmann et al., 2011: 8; Mostacero et al., 2011: 220).

*Gentianella chamuchui*, es una planta endémica del Perú, conocida comúnmente como “chamochui”, “chinchimali”, “genciana”, “lirambo”, “hapallashakoc”, “corpus hui macho”, “shalcadino”, que se ha reportado entre los 3000 y 4500 m.s.n.m. desde el sur de Cajamarca hasta el norte de Ancach (Mostacero et al., 2011: 255). Entre sus usos etnomedicinales destacan su acción

antidiabética, antipalúdica, colagoga, contra enfermedades nerviosas, digestivas, emanagoga, febrífuga, hepatoprotectora, purificadora de la sangre y tónica (Brako y Zaruchi, 1993: 232).

A pesar de que, el uso de plantas como terapia complementaria y alternativa a diversos padecimientos, representa una práctica común y cotidiana con antecedentes milenarios a nivel mundial, en muchos casos no se ha profundizado lo suficiente en el conocimiento de las mismas, no se han validado las propiedades que se les atribuyen, ni se han aislado y caracterizado las moléculas responsables de dichas acciones beneficiosas. El objetivo del estudio fue comparar el efecto hipoglucemiante de extractos obtenidos a partir de *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle, *Gentianella nitida* y *Gentianella chamuchui* en *Rattus rattus*.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 OBJETO DE ESTUDIO

El material biológico objeto de estudio fueron las especies vegetales del género *Gentianaceae*: *Gentianella bicolor*, *Gentianella chamuchui* y *Gentianella nitida*, las cuales fueron debidamente recolectadas, identificadas y procesadas para evaluar el efecto hipoglucemiante de las mismas en *Rattus rattus*.

### 2.2 MEDIOS

#### Recolección y procesamiento inicial del material vegetal

La *Gentianella bicolor* (Wedd.) Fabris ex J.S. Pringle “Corpus huay” fue recolectada en las alturas de Quiruvilca, Santiago de Chuco, Departamento de La Libertad a 3500 m.s.n.m, en la mañana del 22 de agosto del 2013. La *Gentianella chamuchui* “Genciana” fue recolectada en las alturas de Cajamarca a 3100 m.sn.m, en la mañana del 28 de agosto del 2013. Ambos especímenes fueron correctamente identificados y depositados en el *Herbarium Truxillense* de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT) con los códigos de herbario: HUT-57361 y HUT-57360 respectivamente. La *Gentianella nitida* “Hercampuri” fue adquirida a través de un poblador de las alturas de Huancavelica el 16 de agosto del 2013 y fue examinada y correctamente identificada por el botánico José Mostacero en la Ciudad de Trujillo.

#### Animales de experimentación

Los animales de experimentación que se utilizaron en este estudio fueron de la especie *Rattus rattus*, cepa Sprague Downley, con  $200 \pm 10$  gramos de peso corporal, procedentes del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú, con la certificación de salud correspondiente.

#### Materiales generales

La enzima Estreptozotocina que se utilizó en la experimentación fue de la marca Sigma Aldrich (USA).

El equipo para medir los niveles de glucosa en sangre fue un glucómetro marca ACCU-CHEK® Active de Roche (Alemania), que emplea tiras reactivas ACCU-CHEK® específicas para dicho glucómetro.

Equipos y Reactivos usuales para el trabajo de laboratorio de acuerdo a lo descrito en los procedimientos.

### 2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS

#### Preparación de los extractos acuosos

Todo el material vegetal recolectado, secado y triturado, de forma independiente fue colocado en un matraz con tapa hermética. Se mezcló 1kg de material vegetal con 3 litros de agua destilada (proporción 1:3) y se dejó reposar por 24 horas. Al día siguiente se calentó a 50-60 °C durante 15 minutos y se filtró. A continuación se añadió más agua destilada al material vegetal en la misma proporción del día anterior, se calentó por 15 minutos 50-60 °C y se filtró, repitiéndose el proceso una vez más. El filtrado resultante se concentró con vapor de agua hasta sequedad. El residuo se guardó en refrigeración a 4°C hasta su redisolución para las evaluaciones biológicas (Miranda y Cuéllar, 2000: 65).

### **Inducción de diabetes con Estreptozotocina**

Se realizó el ensayo de inducción de hiperglucemia con la administración de una dosis de 60 mg/kg de Estreptozotocina (STZ) (SIGMA, USA) vía intra peritoneal (*i.p.*), en ratas adultas, sanas, con un peso entre 200±10 g, mantenidas 24 horas en ayuna. La STZ se disolvió en una solución amortiguadora de citrato de sodio 0,1M (pH 4,5) que se preparó justo antes de ser administrada. El grupo Control sano recibió una inyección *i.p.* de 2 mL/Kg de peso de solución amortiguadora de citrato de sodio (0,1M; pH 4,5). Transcurridas 48 horas se procedió a la determinación de las concentraciones de glucosa en sangre para lo cual se realizó una pequeña incisión en la punta de la cola de los animales para la toma de las muestras de sangre. Los niveles de glucemia fueron determinadas mediante el empleo de un glucómetro ACCU-CHEK® Active (Roche, Alemania). Las ratas cuyo valor de concentración de glucosa en sangre estuvieron por encima de 250 mg/dL, fueron seleccionadas como diabéticas para el presente estudio.

Todos los animales que conformaron el estudio se mantuvieron 7 días antes, y durante el ensayo (28 días en total), con una alimentación estándar y agua *ad libitum*, a una temperatura de 20 ± 4°C, un foto-período de 12 horas, y una humedad relativa de 50 ± 5%. Condiciones de alojamiento y alimentación según lo establecido. El estudio se efectuó de acuerdo con las reglamentaciones y principios éticos existentes para la investigación en animales de experimentación.

### **Evaluación de la respuesta hipoglucemiante de los extractos acuosos de *Gentianella bicolor*, *Gentianella nítida* y *Gentianella chamuchui***

Se conformaron cinco (05) grupos de experimentación de 07 animales cada uno. El grupo 01 estuvo conformado por ratas sanas y el resto de los grupos estuvo conformado por ratas con diabetes inducida con una inyección intraperitoneal de STZ. Un grupo de ratas diabéticas fue tomado como control positivo que no recibió tratamiento. El resto de grupos recibió una dosis diaria de 500 mg/kg de peso del extracto acuoso de *Gentianella bicolor*, *Gentianella nítida* y *Gentianella chamuchui* respectivamente durante 21 días. La administración de los extractos acuosos se realizó diariamente mediante el empleo de cánulas intragástricas de 0,7mm de diámetro. Para determinar los niveles de glucosa en sangre se colectaron las muestras por incisión en la cola de los animales de experimentación a las: 03, 06 y 24 horas después de la administración oral de los tratamientos. Las concentraciones de glucosa en sangre se determinaron utilizando un glucómetro ACCU-CHEK® active (Roche, Alemania).

### **Extracción y fijación de los páncreas de los animales de experimentación**

Se seleccionaron al azar y sacrificaron 02 animales de cada grupo de experimentación con la finalidad de realizar un análisis anátomo-histopatológico y determinar el efecto sobre las células β del tratamiento aplicado en cada grupo de experimentación. Luego de anestesiar y sacrificar las ratas seleccionadas, se procedió a la disección de las mismas y a la extracción de todo el sistema digestivo junto con el páncreas para la fijación en una solución de formaldehído al 10%, pH=7,6, según procedimiento reportado por Bancroft y Gamble (2002: 140: 347). Al día siguiente se procedió a la separación de los páncreas del resto de los órganos en fijación y se colocaron en recipientes con nueva solución fijadora para garantizar un adecuado proceso de fijación.

### **Cortes histológicos y coloración de los especímenes mediante el método de Hematoxilina de Harris y Floxina B**

Se procedió al lavado de los especímenes y se realizó una deshidratación creciente con alcohol etílico de los páncreas a analizar histológicamente. Posteriormente se sumergieron los especímenes en xilol durante 04 horas antes de ser sumergidos en una solución de Histosec a 56°C por un período de 04 horas según procedimiento descrito por Bancroft y Gamble (2002: 357). Una vez finalizada la etapa de penetración del Histosec, se procedió a la etapa de inclusión definitiva o formación del bloque en la cual se llevó a cabo el vertimiento de Histosec fundido a una temperatura de 60-65°C en moldes de metal. Después de 30 minutos, se solidificaron los bloques y se recortaron en forma de pirámide cuadrangular truncada antes de realizar los cortes de cada espécimen en secciones de 06 micrómetros. Se realizaron varios cortes de la cabeza, cuerpo y cola del páncreas de cada animal seleccionado para el estudio histológico.

Para garantizar que el espécimen quedó adherido durante el procesamiento ulterior, la superficie de los portaobjetos fueron recubiertos previamente con glicerina y albúmina de Jelly antes de colocar las secciones cortadas. Una vez que el agua se evaporó y habiendo quedado extendida la sección en el

portaobjetos, se procedió a un secado exhaustivo de los mismos en estufa a 40°C durante toda la noche. El procedimiento para la coloración de los cortes histológicos mediante el método de Hematoxilina de Harris y Floxina B se realizó según lo descrito por Bancroft y Gamble (2002: 463).

### **Observación y análisis histopatológico del páncreas de los animales de experimentación**

Se procedió a la observación de todos los cortes histológicos realizados de la cabeza, cuerpo y cola de los páncreas de los animales seleccionados, mediante el empleo de un microscopio óptico con aumentos de 65X, 200X y 450X. A continuación se realizaron las microfotografías correspondientes empleando una cámara de alta resolución marca Carl Zeiss (Alemania).

### **Procesamiento estadístico**

Para comparar los grupos de trabajo en una variable en cuestión se utilizó un Anova de clasificación simple, seguido de una prueba de comparación múltiple (Tukey-b). Para las transformaciones que cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se empleó el estadístico de Levene. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico Statistica versión 5.01 para Windows.

## **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Determinación de la respuesta hipoglucemiante de los extractos acuosos obtenidos a partir de las especies incluidas en el estudio**

Durante los primeros 13 días de experimentación no se observó un efecto hipoglucémico significativo con ninguno de los tratamientos administrados. A partir del día 14 de experimentación, se observó una disminución de la glucemia en los grupos a los que se le administraron extractos de plantas de la especie *Gentianella*, que se mantuvo hasta el día 21 que finalizó el estudio.

Se realizaron comparaciones entre los grupos de experimentación a los cuales se les aplicó los diferentes tratamientos utilizando diseños completamente aleatorizados y mediante el análisis de varianza, en las dos etapas del experimento: los primeros trece días de tratamiento, donde no se observó diferencias en los niveles de glucemia de los animales de experimentación, y del 14 al 21 día de tratamiento, donde se observaron diferencias en las glucemias promedios de los animales que sobrevivieron en los diferentes grupos. El ANOVA que se aplicó fue de una sola vía sin interacciones en el tiempo de aplicación 06 horas después de aplicado cada tratamiento, puesto que a las 06 horas fue cuando se observó la mayor variación de los niveles de glucemia a partir del día 14 hasta el día 21 de experimentación.

La Tabla 1 muestra que no hay homogeneidad de varianzas en los diferentes grupos en los primeros trece días de tratamiento ( $p < 0.05$ ) y del 14 al 21 día de tratamiento ( $p = 0.05$ ) sí hay homogeneidad de varianzas a las 06 horas de aplicado el tratamiento en cada grupo de animales de experimentación.

**Tabla 1.** Prueba de Homogeneidad de varianzas en los primeros 13 días de tratamiento y del 14 al 21 día de tratamiento a 06 horas de aplicado el tratamiento en cada grupo de animales de experimentación.

	Prueba de homogeneidad de varianzas			
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
A 6h (1 a 13 días)	6.47	6	35	0.000
A 6h (14 a 21 días)	2.57	6	35	0.05

Se realizó la prueba de Tukey-b de comparación de medias para determinar el grupo que presentó mayor diferencia promedio respecto a los demás. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la prueba de Tukey-b de comparación de medias de los grupos durante los primeros 13 días de experimentación, donde se evidencia que el grupo control negativo es el que difiere de los otros grupos de experimentación; observándose subconjuntos homogéneos, lo cual significa que no hay diferencias significativas entre los grupos de animales de experimentación con diabetes inducida durante los primeros trece días de experimentación.

**Tabla 2.** Prueba de Tukey-B de comparación de medias durante los primeros trece días de experimentación a 06 horas de aplicado el tratamiento respectivo en cada grupo de experimentación.

Prueba Tukey-B (01 a 13 días)			
Grupos de experimentación	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Control negativo (sin diabetes)	7	115.34	
Diabéticas + <i>G. nitida</i>	7		430.71
Diabéticas sin tratamiento	7		434.51
Diabéticas + <i>G. bicolor</i>	6		437.57
Diabéticas + <i>G. chamuchui</i>	5		443.76

La Tabla 3 muestra los resultados de la prueba de Tukey-b de comparación de medias del día 14 al 21 de experimentación, donde se evidencia que el grupo control negativo difiere de los otros grupos de experimentación con diabetes inducida. Además se observa que los grupos que fueron tratados con *G. bicolor*, *G. chamuchui* y *G. nitida* forman un grupo homogéneo y los grupos que fueron tratados con *G. chamuchui*, *G. nitida* y el grupo que no recibió ningún tratamiento forman otro grupo homogéneo, diferenciándose de éstos el grupo que recibió el tratamiento con *G. bicolor*.

Al observar los subconjuntos homogéneos de la Tabla 3 y los respectivos promedios, se puede concluir que el grupo tratado con el extracto acuoso de *G. bicolor* fue el que provocó el mayor efecto hipoglucemiante respecto al resto, mostrando una disminución de la glucemia alrededor del 40 %.

**Tabla 3.** Prueba de Tukey-B de comparación de medias del 14 al 21 día de experimentación a 06 horas de aplicado el tratamiento respectivo en cada grupo de experimentación.

Prueba Tukey-B (14 a 21 días)				
Grupos de experimentación	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Control negativo (sin diabetes)	7	101		
Diabéticas + <i>G. bicolor</i>	6		341.89	
Diabéticas + <i>G. chamuchui</i>	5		380.27	380.27
Diabéticas + <i>G. nitida</i>	7		414.52	414.52
Diabéticas sin tratamiento	7			426.62

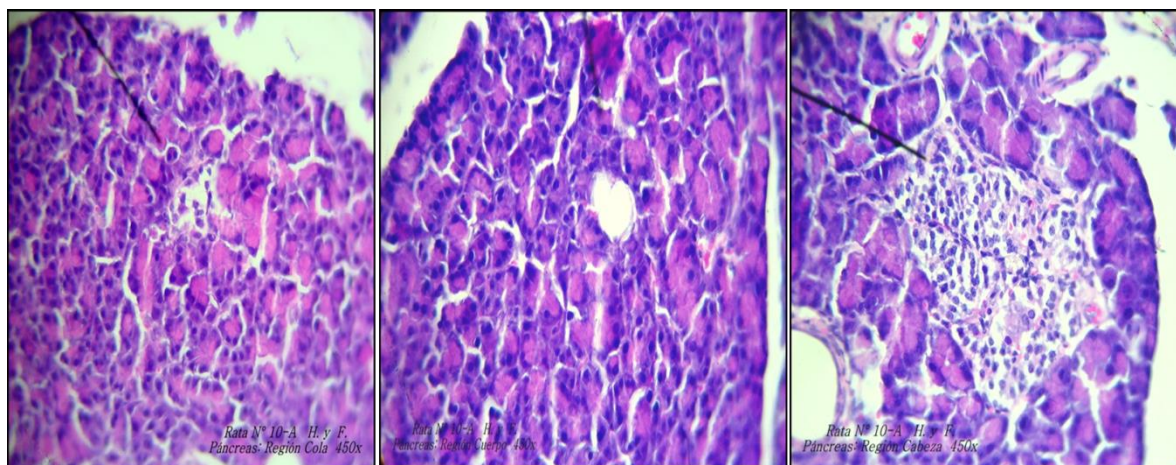
Estudios anteriores donde se ha evaluado el efecto hipoglucemiante de *Gentianella umbellata* y *Gentianella thyrsoides*, especies de la familia *Gentianaceae*, han observado un efecto hipoglucemiante agudo a las 05 horas después de administrar el extracto diclometánico de esta especie desde el primer día de experimentación (Salazar, 2011: 111; Tomas, 2000: 42). Hasta la fecha no se ha encontrado un estudio anterior donde se haya empleado plantas de la familia *Gentianaceae* y se haya reportado el mismo comportamiento observado en este estudio. Según los reportes de la población que emplea estas plantas por sus efectos hipoglucemiantes, se evidencia un efecto hipoglucemiante agudo con el empleo de las especies de la familia *Gentianella* evaluadas. Sin embargo, en este estudio se observó un efecto hipoglucemiante a partir del día 14 de experimentación que se mantuvo hasta el día 21 de experimentación, el cual fue más notorio y estadísticamente significativo a las 06 horas después de administrar los extractos acuosos de *G. bicolor* y *G. chamuchui*. Hay que destacar que a medida que avanzó la experimentación, los niveles de glucemia de los animales incluidos en el estudio llegaron en muchos casos por encima de los 600 mg/dL y lograr una disminución hasta 341 mg/dL (alrededor del 40 %), como ocurrió con el tratamiento con *G. bicolor*, es una disminución importante y estadísticamente significativa.

**Análisis histopatológico de los cortes de páncreas de animales de experimentación**

Se realizaron los cortes histológicos de páncreas y la coloración respectiva de los mismos con Hematoxilina de Harris y Floxina B según el procedimiento descrito anteriormente. Con este procedimiento se logró una tinción color azul oscuro-violeta en los núcleos y de distintos tonos de rojo en el citoplasma de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas, lo cual permitió una excelente observación al microscopio óptico de los cortes histológicos realizados a los páncreas de todos los animales seleccionados para este fin.

A continuación se muestran las imágenes de los cortes histológicos realizados, así como el análisis histopatológico del páncreas, tanto de la región cabeza, cuerpo como de cola del páncreas de los animales seleccionados al azar en cada grupo de experimentación con diabetes inducida, tanto del grupo de experimentación que no recibió tratamiento como de los grupos que recibieron tratamiento con alguno de los extractos acuosos obtenidos de las especies *Gentianella*.

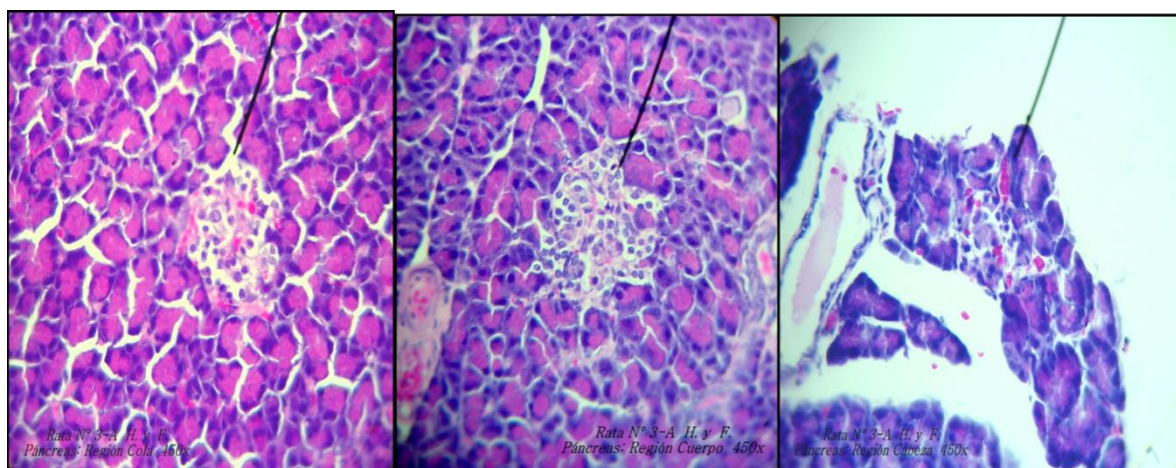
En la Figura 1 se muestran cortes histológicos de páncreas de un animal de experimentación perteneciente al grupo diabético que no recibió ningún tratamiento. Se puede apreciar un tejido pancreático con una disminución marcada de la cantidad de islotes de Langerhans, observándose sólo 1 a 2 por campo microscópico. Alteraciones morfológicas del núcleo mostrando: picnosis, carirrexis y cariólisis. Hipertrofia y Atrofia de las células beta (aumento y disminución del volumen celular). Se aprecia degranulación de las células beta e hipertrofia con disminución del tamaño de los islotes. La morfología insular está alterada, mostrando contornos estrellados o disgregados con presencia de congestión vascular. También se observa necrosis de los islotes de Langerhans y lesiones degenerativas de las células  $\beta$  del páncreas.



**Fig. 1.** Microfotografía de cortes histológicos de *Rattus rattus* perteneciente al grupo de experimentación con diabetes inducida que no recibió tratamiento. De izquierda a derecha se muestran los cortes histológicos de cola, cuerpo y cabeza de páncreas, con un aumento de 450X.

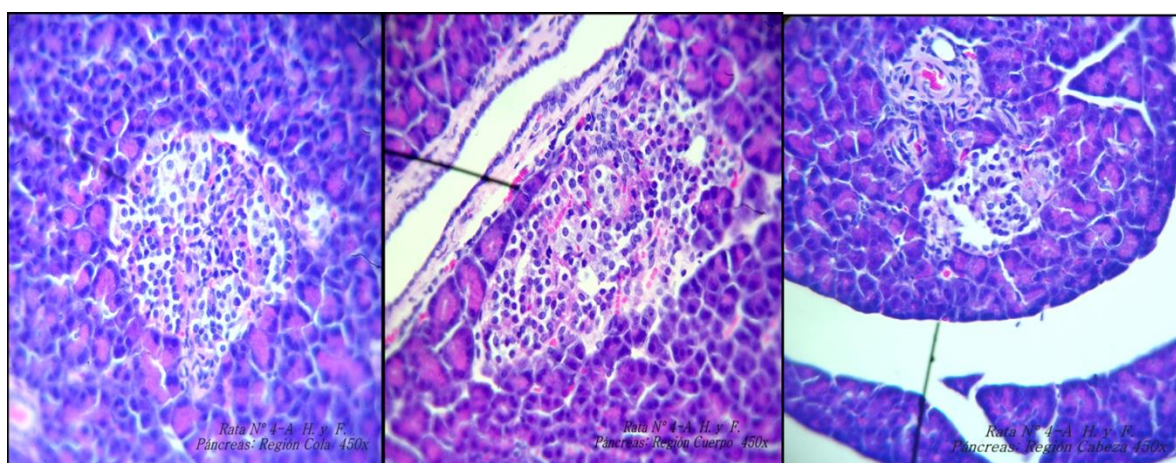
En la Figura 2 se observan los cortes histológicos de páncreas de un animal de experimentación perteneciente al grupo que recibió el tratamiento con *G. nitida*. Se puede observar un tejido pancreático normal pero con la presencia de islotes de Langerhans pequeños y atróficos. Además se aprecia la presencia de vasos congestionados con infiltrados linfoides perivascular.





**Fig. 2.** Microfotografía de cortes histológicos de páncreas de *Rattus rattus* perteneciente al grupo de experimentación que recibió el tratamiento con *G.nitida*. De izquierda a derecha se muestran los cortes histológicos de cola, cuerpo y cabeza de páncreas, con un aumento de 450X.

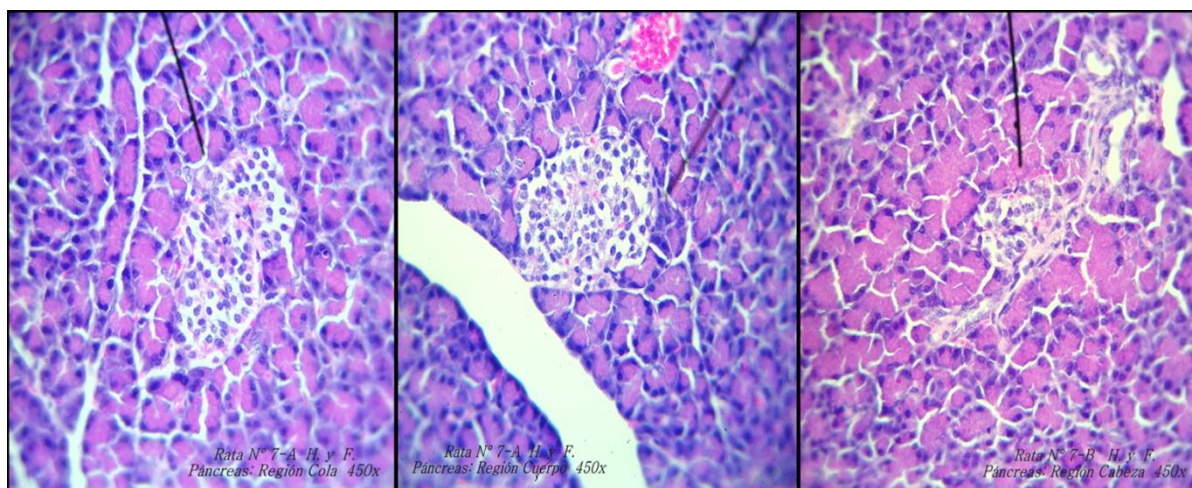
En la Figura 3 se muestran cortes histológicos de páncreas de un animal de experimentación que recibió tratamiento con *G. chamuchui*. Como se puede apreciar los islotes de Langerhans están atróficos y de tamaño muy reducido, sobretodo en la región de la cabeza del páncreas. También se observa presencia de vasos congestionados, sobretodo en la región del cuerpo del páncreas.



**Fig. 3.** Microfotografía de cortes histológicos de páncreas de *Rattus rattus* perteneciente al grupo de experimentación que recibió el tratamiento con *G. chamuchui*. De izquierda a derecha se muestran los cortes histológicos de cola, cuerpo y cabeza de páncreas, con un aumento de 450X

En la Figura 4 se muestran cortes histológicos de páncreas de un animal de experimentación perteneciente al grupo que recibió tratamiento con *G. bicolor*. En la región de cola y cuerpo de páncreas se puede observar una estructura pancreática homogénea, con presencia de islotes de Langerhans prácticamente de tamaño normal. No se observa presencia de infiltrados linfoides y tampoco es abundante la presencia de vasos congestivos. Se aproxima morfológicamente a un corte histológico de páncreas normal en las regiones de cola y cabeza, sin embargo, la región de cabeza de páncreas muestra islotes pequeños en mayor número que en cortes anteriores y se observa la presencia de células primitivas (células madres), lo que evidencia signos de regeneración morfológica en esta región.





**Fig. 4.** Microfotografía de cortes histológicos de páncreas de *Rattus rattus* perteneciente al grupo de experimentación que recibió tratamiento con *G. bicolor*. De izquierda a derecha se muestran los cortes histológicos de cola, cuerpo y cabeza de páncreas, con un aumento de 450X

Tal como se observó en los cortes histológicos, los páncreas de los animales de experimentación a los cuales se le administraron los extractos acuosos de las especies de *Gentianella*, en especial los extractos obtenidos a partir de *G. bicolor* y de *G. chamuchui*, muestran un tejido pancreático muy conservado, morfológicamente similar al tejido pancreático de animales de experimentación sanos, lo cual sugiere una recuperación y/o regeneración de las células  $\beta$  del páncreas que explicarían el comportamiento de las glucemias de los animales de experimentación que recibieron dichos tratamientos.

El hecho de no observar una disminución de la glucemia en los animales de experimentación sino hasta el día 14 de evaluación, sugiere que el efecto hipoglucemiante de estas plantas es crónico y probablemente, de haberse prolongado el tiempo de experimentación, se hubiera observado una disminución mayor de las glucemias con el tiempo, así como una mayor recuperación del tejido pancreático, de los islotes de Langerhans y por tanto un aumento de la producción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas.

La teoría planteada se refuerza con un trabajo previo publicado por Alimohammadi et al. (2013: 8), donde se evidenció que el extracto hidroalcohólico de la especie *Nigella sativa* L. administrado en ratas con hiperglucemia inducida por la administración de Estreptozotocina no solo tuvo un efecto hipoglucémico a partir del día 16 de experimentación, sino que además se observó un incremento del número de células  $\beta$  de los islotes de Langerhans y de la producción de insulina en el tejido pancreático de las ratas diabéticas tratadas con dicha especie.

#### IV. CONCLUSIONES

El efecto hipoglucemiante observado a partir del día 14 de experimentación, con la administración de 500 mg/Kg de peso del extracto acuoso obtenido a partir de *Gentianella bicolor* fue superior al observado con la administración de 500 mg/Kg de peso del extracto acuoso obtenido a partir de *Gentianella chamuchui*, quien a su vez provocó un efecto hipoglucemiante mayor que el que se observó con la administración de *Gentianella nitida*. En tal sentido, es necesario realizar la separación e identificación de los metabolitos presentes en los extractos acuosos de *Gentianella bicolor*, *Gentianella chamuchui* y *Gentianella nitida* que pudieran ser responsables del efecto hipoglucemiante observado.

Se observó una mayor recuperación y/o regeneración de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans de los páncreas de los animales de experimentación a los que se le administró 500 mg/Kg de peso del extracto acuoso obtenido a partir de *Gentianella bicolor*, recuperación que fue menos notoria con la administración de 500 mg/Kg de peso del resto de los extractos acuosos obtenidos a partir de

especies de *Gentianella*. Se deben realizar ensayos inmunohistoquímicos con anticuerpos monoclonales anti-insulina, para identificar la presencia de insulina en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans de páncreas y comprobar la recuperación de la funcionalidad del tejido pancreático regenerado de los animales que recibieron tratamiento con los extractos acuosos de las especies de *Gentianella* incluidas en el estudio.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a todas las personas que han brindado asistencia técnica durante la ejecución de este estudio, en especial al Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, a la Dra. Milagros Abad, Jefa del Servicio de Patología del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas, al botánico Dr. José Mostacero y al Dr. Armando Cuéllar Cuéllar de la Facultad de Farmacia de la Universidad de la Habana, Cuba.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIMOHAMMADI, S., HOBENAGHI, R., JAVANBAKHT, J., KHERADMAND, D., MORTEZAEI, R., TAVAKOLI, M., KHADIVAR, F., AKBARI, H. 2013. **Protective and antidiabetic effects of extract from *Nigella sativa* on blood glucose concentrations against streptozotocin (STZ)-induced diabetic in rats: an experimental study with histopathological evaluation.** *Diagnostic Pathology*, 8: 137- 144.
- APIJADE, J. 2006. **Botanical compositions having oral insulin-like hypoglycemic activity, with hypolipidemic and antimicrobial activities.** EP 1723960 A1, 2006 Nov 22.
- BANCROFT, J., GAMBLE, M. 2002. **Theory and Practice of Histological Techniques.** 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- BECERRA, J. 1991. **Estudio morfo-histotaxonomico e identificación de los fitoconstituyentes de la especie *Gentianella alborosea (Gilg) Fabris "Hercampuri"*.** Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- BRAKO, L., ZARUCHI, J. 1993. **Catalogue of the flowering Plants and Gymnosperm of Peru.** Missouri Botanical Garden, USA.
- BUSSMANN, R., GLENN, A. 2010. **Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health.** *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 6: 30-42.
- BUSSMANN, R., GLENN, A., MEYER, K., KUHLMAN, A., TOWNESMITH, A. 2011. **Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru.** *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 6: 10-25.
- BUSSMANN, R., MALCA, G., GLENN, A., SHARON, D., NILSEN, B., PARRIS, B. 2011. **Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru.** *J. Ethnopharmacol.*, 137(1): 121-40.
- DER MARDEROSSIAN, A., BEUTLER, A. 2008. **Therapeutic Uses Index.** Wolters Kluwer Health, Inc. The Review of Natural Products, 1-23.
- KE-WEI, W. 2013. **Assessment of the Magnitude of Contextual and Individual Demographic Effects on Diabetes Mellitus and Glucose Intolerance in Rural Southwest China: A Multilevel Analysis.** *PLoS ONE*, 8(7): 6855-65.

- LEON, B., ROQUE, J., ULLOA, C. 2006. **El Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Perú.** Revista Peruana de Biología, 13(2): 339-54.
- MIRANDA, M., CUELLAR, C. A. 2000. **Farmacognosia y Productos naturales.** EIMAV. Ministerio de Educación, La Habana, Cuba.
- MOSTACERO, L. J., CASTILLO, P. F., MEJIA, C. F., GAMARRA, T. A., CHARCAPE, R. J., RAMIREZ, V. R. 2011. **Plantas Medicinales del Perú. Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica.** Asamblea Nacional de Rectores, Lima.
- PATELL, V. 2008. ***Eugenia jambolana* plant extracts for the treatment of diabetes and the extraction process thereof.** WO 2008062245 A1. 2008 May 29.
- PEREZ, M. 2002. **Compuestos aislados de plantas con actividad antiinflamatoria, antiviral e hipoglucemiante.** Primera edición, Lima.
- SADASHIV, D. 2009. **A hypoglycemic herbal extract composition for reducing blood sugar levels in mammals.** WO 2009098702 A3. 2009 Dec 30.
- SALAZAR, J. 2011. **Contribución al Estudio Químico y Farmacológico de la *Gentianella umbellata* (G. Don) Fabris.** Tesis presentada por Para optar el Grado Académico de Magister en Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- TOMAS, G. 2000. **Estudio fitoquímico y farmacológico de la *Gentianella thyrsoides* Hooker Fabris.** Tesis para optar por el título de Magíster, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.
- WAYNE, D. 1997. **Triterpenoid compound for the treatment of diabetes.** US5691386 A. 1997 Nov 25.
- ZABEER, A. 2004. ***Argyrobium roseum* plant extracts for treating diabetes.** WO 2004032949 A1. 2004 Apr 22.