

INSTITUTO NACIONAL DE ANGIOLOGIA Y CIRUGIA VASCULAR



**Efecto antihiperglucemiante en condiciones
fisiológicas y seguridad de la Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ)
en modelos animales.**

**Tesis Presentada en Opción al grado científico de Doctor en
Ciencias Médicas.**

Autor

Dr. Andrés Samuel Fleitas Estévez

Tutor

Dr. Gerardo Rodríguez Fuentes

La Habana, 2013

DEDICATORIA

A mis padres por educarme con tanta paciencia, comprensión, dedicación y amor.

Nina y Silvano.

A Leysi mi niña por su amor.

A mis hermanos que en cada momento me brindaron su apoyo

Noemí, Pablo y Mary.

A mi esposa Gisela por soportarme.

A mis profesores por sus enseñanzas, constancia y dedicación.

A mis amigos.

A la vida.

AGRADECIMIENTOS

Como siempre se dice y nunca deja de ser verdad, un trabajo por el doctorado no es solamente el producto de la creación del autor que figura en la portada. Es también el trabajo de todos aquellos que colaboraron directa o indirectamente para que fuera posible; tanto, aquellos que me enseñaron cuanto sé, que influyeron en mi formación y pensar (con virtudes y defectos) como los que finalmente dieron su ayuda y apoyo.

En fin, como es imposible enumerar a tantos y tan variados personajes, no puedo más que contentarme con poner en letras mi agradecimiento para los que participaron directamente en la realización y culminación del trabajo. A aquellos que aportaron su tiempo, su esfuerzo y sobre todo, que se armaron de muchísima paciencia, ellos son:

A al Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular y en particular al que fuera su director el Dr. José I. Fernández Montequín por darme la oportunidad de trabajar en este tema, por la confianza y el apoyo recibido hasta llegar a la realización de este trabajo.

A mi tutor Dr. Gerardo Rodríguez que desde el primer momento me brindó la oportunidad de trabajar con este producto, y me ofreció toda su guía, su apoyo, su atención, sus conocimientos y muchos recursos, para él: Mil gracias.

A la Dra. Milagros García por las facilidades que me dio para la conclusión de esta tesis, por su crítica oportuna.

A Simón y Beatriz que trabajaron junto a mí en este tema, sus empeños y servicios, no quedaron en el olvido.

A mis compañeros de trabajo Arquímedes, María Antonia y todos los demás, en especial al Dr. Ameneiro que siempre estuvo dispuesto a ayudarme de forma desinteresada cuando lo necesité.

A Milagros Griffith, Cristina y Caridad.

Yunier, María Eugenia y Miriam.

A quien mucho le debo, LJ Pérez Pérez, por su colaboración desinteresada.

También agradezco la colaboración de otras instituciones como el IMRE, el CEMPALAB, el IFAL, la facultad de Farmacia de Montpellier, que me facilitaron la realización de

muchos de los trabajos desarrollados y la colaboración especial del Dr. Lois Charles de Menorval por su gestión y apoyo en el trabajo. A Gerard Cros y a Jacqueline Assay.

Mi sincero agradecimiento a los críticos por darme su benévola opinión.

El trabajo, desarrollado a lo largo de más de diez años, ha contado con la participación de muchos compañeros valiosos y resulta imposible nombrarlos a todos, pero para ellos, gracias.

Muchas gracias de todo corazón a todas las personas e instituciones que de una forma u otra contribuyeron a que este trabajo llegara a su fin.

A todos muchas gracias.

RESUMEN

La hiperglucemia es protagonista en la etiopatogenia de las complicaciones vasculares del paciente diabético. La diabetes es una enfermedad metabólica crónica, causa importante de morbi-mortalidad y considerada un problema de salud en el ámbito mundial. El control glucémico, por medio del tratamiento higiénico dietético y medicamentoso, es esencial, de ahí la importancia del desarrollo de nuevos medicamentos que contribuyan a lograr este objetivo. Evaluar el efecto antihiperglucemiante y la seguridad de la Zeolita: Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) en animales de experimentación. Se trabajó con la Fe²⁺-Clinoptilolita (zeolita natural, purificada y modificada con iones Fe²⁺). Los estudios se llevaron a cabo en: perros Beagles, conejos Chinchilla, ratas Wistar, ratas CENP: SPRD, ratones CENP: NMRI. Se realizaron estudios farmacológicos (propiedades antihiperglucemiantes, efecto dosis-respuesta y de seguridad. Se realizaron experimentos para otros posibles efectos biológicos. Se encontró la dosis efectiva media de la Fe²⁺-Clinoptilolita. Se observó una disminución de la glucemia en perros *Beagles* tratados con dosis única. No se encontró diferencias significativas al comparar el efecto antihiperglucemiante del Fe²⁺-Clinoptilolita con la Acarbosa. Se observó que el tratamiento con FZ disminuyó la biodisponibilidad de glucosa y la glucemia post-estimulación. Se demuestra según los estudios de toxicidad aguda y genotoxicidad realizados a Fe²⁺-Clinoptilolita que no es peligrosa para la salud animal y no produce daño. Por el efecto antihiperglucemiante demostrado, la amplia disponibilidad la materia prima y lo económico de su producción, se propone continuar otros estudios que conlleven al registro médico.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.	1
CAPITULO I. REVISION BIBLIOGRAFICA.	5
1.1. Antecedentes de Zeolitas.	6
1.2. Zeolitas: Propiedades, modificaciones y aplicaciones farmacéuticas_	8
1.3. Clinoptilolita	10
1.4. Aplicaciones de la Clinoptilolita en medicina.	13
1.5. Zeolita natural purificada (NZ)	17
1.6. Zeolita natural intercambiada Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ), como adsorbente de carbohidratos. Desarrollo y caracterización de FZ	18
1.7. Diabetes Mellitus. Generalidades	21
1.7.1. Tratamiento medicamentoso de la Diabetes Mellitus tipo 2: los antidiabéticos orales (ADO).	23
1.8. La Acarbosa como modelo antihiper glucemiante	24
1.9. Nuevos fármacos.	26
1.10. Insulinas.	26
1.11. Terapia combinada.	26
1.12. Fundamentación de la selección del biomodelo a emplear, el tamaño de la muestra y las dosis empleadas en el trabajo de tesis	27
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.	31
2.1. Materiales	31
2.2. Animales de experimentación.	32
2.3. Metodología general	34
2.4. Flujo de la investigación	34
2.5. Obtención de las muestras de sangre.	35
2.6. Técnicas empleadas	35
2.7. Procedimiento experimental. Evaluación farmacológica de las propiedades antihiper glucemiantes del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ)	36
2.7.1. Efecto de diferentes dosis del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) en ratas Wistar	36

2.7.2. Monitoreo de la biodisponibilidad de glucosa, fructosa y sacarosa, con isótopos marcados ^{14}C en ratas	37
2.7.2.1. Efecto del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre la absorción de la glucosa marcada con ^{14}C en ratas Wistar	37
2.7.2.2. Efecto del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre la absorción intestinal de fructosa marcada con ^{14}C en ratas	38
2.7.2.3. Efecto del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre la absorción intestinal de glucosa proveniente de una fuente de sacarosa marcada con ^{14}C	38
2.7.3. Efecto del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre el control glucémico en ratas hiperglucémicas	39
2.7.4. Efecto de la administración de dosis únicas del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) en perros <i>Beagles</i>.	40
2.7.5. Comparación del efecto antihiperglucemiante del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) con la Acarbosa, en perros <i>Beagles</i>.	41
2.7.6. Evaluación de otros efectos del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre las concentraciones de lípidos y la coagulación, en animales	42
2.7.6.1. Efecto del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos en conejos.	42
2.7.6.2. Efecto del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ) sobre algunos parámetros de la coagulación (tiempo de protrombina y del tiempo de tromboplastina parcial activada con caolín) en perros <i>Beagles</i>.	43
2.8. Estudios toxicológicos realizados al Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ)	44
2.8.1. Toxicidad aguda del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ)	44
2.8.2. Evaluación mutagénica del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ)	45
2.8.2.1. Evaluación mutagénica del Fe^{2+}-Clinoptilolita (FZ). Ensayo citogenético de la médula ósea en ratas CENP: SPRD.	46
2.8.2.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones CENP: NMRI	47
2.8.2.3. Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide en ratones CENP: NMRI	48

2.9. Análisis estadísticos y procesamiento de datos	48
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.	49
3.1. Evaluación de las propiedades antihiperglucemiantes del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) en animales de experimentación.	49
3.1.1. Estudio de diferentes dosis del Fe ²⁺ -Clinoptilolita(FZ) en ratas Wistar	49
3.1.2. Absorción de sacáridos con isótopos marcados en ratas	53
3.1.2.1. Efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) sobre la biodisponibilidad de glucosa marcada con ¹⁴ C en ratas Wistar	53
3.1.2.2. Efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) sobre las biodisponibilidad de fructosa marcada con ¹⁴ C en ratas	55
3.1.2.3. Efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) sobre la biodisponibilidad intestinal de glucosa proveniente de una fuente de sacarosa marcada con ¹⁴ C	56
3.2. Efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) sobre el control glucémico en un modelo de ratas que se le ha provocado hiperglucemia.	58
3.3. Efecto de dosis única del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) en perros Beagles	62
3.4. Comparación del efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) con un fármaco antihiperglucemiante de referencia (Acarbosa), en perros Beagles	70
3.5. Evaluación de otros efectos biológicos del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) en animales de experimentación	75
3.5.1. Efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) sobre las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos en conejos.	75
3.5.2. Efecto del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ) sobre algunas variables que evalúan el mecanismo de la coagulación en perros	78
3.6. Estudios toxicológicos realizados a Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ).	81
3.6.1. Toxicidad aguda del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ)	81
3.6.2. Evaluación mutagénica del Fe ²⁺ -Clinoptilolita (FZ).	81
3.6.2.1. Ensayo citogenético de la médula ósea en ratas CENP: SPRD	82
3.6.2.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones	82

3.6.2.3. Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide en ratones CENP: NMRI	84
Conclusiones	87
RECOMENDACIONES y PROYECCIONES	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	89
GLOSARIO.	103
Publicaciones de los resultados que se presentan en la tesis	104
Presentaciones en eventos	106

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad silenciosa y mortal, con tasas de incidencia y prevalencia en continuo ascenso, que por su naturaleza epidemiológica se ha convertido en un serio problema de la salud pública a nivel mundial donde Cuba no está exenta de ello. Alrededor de 240 millones de personas en todo el mundo sufren de diabetes y como consecuencia de ella mueren cada año cerca de cuatro millones de personas (1-3).

Los pacientes diabéticos acumulan 25 millones de días de hospitalización anual y en este período ocasionan gastos directos e indirectos que alcanzan la elevada cifra de 20 000 millones de dólares. En Cuba hay alrededor de 250 000 diabéticos que están dispensarizados en consultas, atención primaria de salud y especializada, que representan el 2.3% de la población cubana. La calidad de vida de estos pacientes es mala debido a la discapacidad que pueden producir complicaciones como la ceguera, las amputaciones y la necesidad de hemodiálisis (4).

En este sentido, la búsqueda de nuevos fármacos que actúen en los diferentes mecanismos patogénicos de la enfermedad constituye un reto actual para los investigadores de las ciencias afines. Estos argumentos indican que es necesario el desarrollo de nuevos productos que contribuyan a un mejor tratamiento y control de la diabetes y otras afecciones relacionadas con la obesidad, la insulino resistencia y el síndrome metabólico.

Durante las últimas tres décadas las zeolitas han atraído la atención de la comunidad científica como resultado de su creciente aplicación en diversas ramas, por sus propiedades físicas y químicas, su elevada estabilidad químico-física en ambientes biológicos y por su bajo costo de producción (5,6).

Según la bibliografía consultada existen pocos trabajos sobre la utilización de zeolitas como medicamentos. Las farmacopeas no la recogen como materia prima o como producto activo de medicamentos de una forma explícita, ya que sus efectos farmacológicos comienzan a describirse. Sin embargo, en el mercado cubano se han elaborado algunos productos tales como: antiácidos (Neutracid), un antidiarreico (Enterex) y un principio activo con actividad microbicida (ZZ) (5-8).

En Cuba se ha desarrollado un nuevo material zeolítico (Fe^{2+} -Clinoptilolita) denominado FZ, se empleó como materia prima la roca zeolítica del yacimiento Tasajeras, provincia Villa Clara, que cumple con la norma cubana NC 625:2008 (9). Este producto ha sido modificado para obtener el nuevo material, con una transformación hidrotermal de NZ mediante disoluciones ácidas en FeSO_4 (10-12), en la que existe una nueva conformación de los átomos y agregados moleculares en sus cavidades y en la superficie externa de los cristales (12), que le otorga una selectividad para la captura de glucosa en disoluciones. Los estudios *in vitro* han demostrado que la glucosa una vez adsorbida no se libera fácilmente, por poseer un fuerte enlace con la estructura de este mineral (10-12).

Las investigaciones desarrolladas han demostrado que las zeolitas naturales poseen propiedades biológicas en su interacción con el medio, y se ha observado una alta especificidad en algunos de los materiales derivados.

Los antecedentes expuestos, así como la comprobada estabilidad de la clinoptilolita natural durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal (7, 8,13), constituyen una sólida base para trabajar en el desarrollo de un producto zeolítico con actividad adsorptiva de glucosa y por ende con propiedades antihiper glucemiantes. Lo que representa una ventaja si se tiene en cuenta que una de las problemáticas de mayor atención por parte de la comunidad médico-farmacéutica en todo el mundo, está relacionada con la disminución de los efectos adversos de los medicamentos.

La necesidad de desarrollar nuevos fármacos que mejoren el control glucémico de los pacientes con trastornos del metabolismo de la glucosa, que sean más eficaces, y más económicos con menos efectos adversos asociados y que puedan llegar a la población enferma cubana que no dispone en estos momentos de un medicamento con efecto antihiper glucemiante, por el alto costo que tienen los existentes en el mercado farmacéutico internacional, nos ha motivado a llevar a cabo esta investigación.

Hipótesis: La Fe^{2+} -Clinoptilolita es un producto que posee efecto antihiper glucemiante y es seguro en animales de experimentación.

Objetivo general: Demostrar el efecto antihiper glucemiante de la zeolita natural purificada y modificada con FeSO_4 denominada FZ en animales de laboratorio y la seguridad preliminar en el empleo del producto como posible candidato a medicamento.

Objetivos específicos.

I- Establecer la relación dosis-efecto de FZ en animales con hiper glucemia provocada.

II- Comparar la efectividad antihiper glucemiante de FZ con un fármaco de referencia, la Acarbosa.

III- Determinar los efectos de FZ sobre variables hematológicas relacionadas con el colesterol y los triglicéridos del plasma en los animales que se le administró el producto.

IV- Determinar la seguridad de FZ mediante estudios de toxicología aguda y genotoxicidad. Así como sobre algunas variables hematológicas relacionadas con la coagulación de la sangre en los animales a los que se les administró el producto.

Aporte científico.

Los estudios presentados en la presente tesis demostraron que FZ es un adsorbente preferente de la glucosa en el sistema digestivo de animales de experimentación que ingieren alimentos ricos en carbohidratos, hallazgo que no se había reportado en la literatura especializada. FZ posee efectos antihiper glucemiantes evidenciados en los estudios en animales y no representa un riesgo biológico que pueda clasificarlo como producto tóxico según los estudios de toxicidad aguda y mutagénesis realizados.

Los resultados que se presentan son el fruto de 10 años de trabajos realizados fundamentalmente en el Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular, perteneciente al Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Los estudios formaron parte de varios programas nacionales tales como: Proyecto: “Desarrollo de principios activos zeolíticos y sus formas terminadas” del Programa Nacional de Medicamentos del MINSAP; del programa de Enfermedades Crónicas No Transmisibles y el de calidad de vida.

En la ejecución de los experimentos participaron además el colectivo de investigadores del Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE) y el del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), ambos de la Universidad de La Habana; contemplados en las líneas de investigación de la Universidad de La Habana: “Salud Humana” y “Nuevos Materiales”

Los resultados se han publicado en revistas especializadas (21 publicaciones Nacionales e Internacionales) y presentados en 16 eventos científicos. Obtuvo un Premio de Investigación de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2008.

La tesis se presenta de la siguiente forma: Introducción (5 Pags), I Revisión bibliográfica (27 Pags), II. Materiales y métodos (28 Pags), III Resultados y Discusión (41 Pag), Conclusiones (1 Pags), Recomendaciones (1Pags), Referencias Bibliográficas (11 Pags). Posee 18 figuras y 12 tablas.

CAPITULO I. REVISION BIBLIOGRAFICA.

Introducción.

La farmacología de los productos naturales es una de las líneas de investigación más promisorias para obtener formulaciones de medicamentos, que contribuyan a aumentar la calidad y la expectativa de vida de las personas afectadas por diferentes enfermedades como la diabetes.

Gran parte de la atención primaria de salud en las comunidades del planeta, se cubre hoy con productos naturales, a la vez que hay una manifiesta tendencia internacional de retorno a lo natural por encima de lo sintético, en particular en las naciones altamente industrializadas (1-4).

Las principales fuentes de productos naturales destinados a la salud en nuestro país se agrupan en: la caña de azúcar (PPG y otros), los recursos forestales (Vimang y aceites esenciales), apícolas (miel, ceras y propóleos), marinos (quitina, prostaglandinas y cartílago de tiburón) y el tabaco (alcaloides y anticuerpos monoclonales). También algunos derivados zeolíticos están en desarrollo con perspectivas halagadoras. Actualmente suman 298 los productos naturales registrados en Cuba como medicamentos y suplementos nutricionales, pero la cifra pudiera multiplicarse dentro de unos años, debido al alto potencial existente y a la cantidad de grupos de investigación que están dedicados a este tema.

Los estudios con zeolitas naturales realizados en los últimos tiempos en nuestro país, han llevado a la obtención de varios fármacos registrados por el Control Estatal para la Calidad de los Medicamentos (CECMED), útiles en el tratamiento de las enfermedades diarreicas, de ciertas anemias y de hongos parásitos de la piel (6-8).

Estos compuestos han colocado a las zeolitas naturales en una posición diferente en cuanto a su especificidad en el tratamiento de enfermedades, que deja abierta la posibilidad de desarrollar nuevos derivados con determinadas características físicas y químicas y acciones farmacológicas específicas, como es el caso de FZ (7, 8,14,15).

El suplemento del producto como antihiper glucemiante constituiría una estrategia práctica en la prevención de las afecciones asociadas a la hiperglucemia y sería una buena opción

desde el punto de vista de la relación costo-beneficio, con respecto a los medicamentos y tratamientos empleados tradicionalmente.

Otra ventaja lo constituye el hecho de que este tipo de tratamiento no requiere de un monitoreo estricto por parte del médico para evitar los posibles efectos colaterales adversos, ya que son muchas las evidencias que plantean que un estricto control metabólico, previene las complicaciones vasculares del paciente diabético (16).

Basado en los riesgos de la hiperglucemia mantenida, se deduce la importancia de mantener las concentraciones normales de glucosa en sangre durante los períodos posteriores a la ingestión de alimentos. Por tal motivo se sugiere que los medicamentos a emplear en el futuro deben actuar en diferentes sitios de la ruta metabólica para regular el metabolismo de la glucosa, de lo contrario deben utilizarse combinaciones de medicamentos (17). Por lo tanto nuevos medicamentos antihiperglucemiantes son necesarios para complementar y hacer más útiles los ya existentes.

1.1. Antecedentes de Zeolitas.

El *status* de las zeolitas naturales ha evolucionado con el tiempo. Durante las últimas tres décadas las zeolitas y otros materiales microporosos análogos, han atraído la atención de la comunidad científica, y actualmente se consideran materiales de gran importancia académica y económica con amplia utilización en numerosas áreas de la industria, la agricultura y la medicina (18).

Las zeolitas naturales, en particular la clinoptilolita, se presentan como una atractiva materia prima para la elaboración de medicamentos, dado su bajo costo y sobre todo, sus propiedades físico-químicas y su alta estabilidad en ambientes biológicos que facilitan una gran variedad de aplicaciones (18).

La complejidad estructural de estos materiales, cuyas propiedades pueden manifestarse simultáneamente y su origen natural hacen que cualquier principio activo, necesite de un análisis especialmente riguroso para garantizar que cumpla con los estrictos requerimientos de calidad que exige la industria farmacéutica. Las autoridades de varios países han liberado el empleo de las zeolitas naturales para su utilización en la alimentación animal (9,13).

1.2. Zeolitas: Propiedades, modificaciones y aplicaciones farmacéuticas.

El término zeolita agrupa un conjunto de materiales microporosos abiertos, donde el diámetro del microporo oscila entre 2 y 20 Å. Este sistema de microporos le confiere a los materiales zeolíticos excelentes propiedades, pues permite la transferencia de materia entre el espacio intra-cristalino y el medio que lo rodea (19,20). La regularidad, en cuanto a forma y tamaño, en el sistema de canales y cavidades interconectadas, son la base de la mayoría de las aplicaciones de estos materiales como "tamices moleculares", y en los procesos de separación de gases y catálisis heterogénea.

El enrejado tridimensional de las zeolitas está compuesto por tetraedros de SiO_2 y Al_2O_3 enlazados entre sí, de un modo tal, que comparten sus oxígenos. Como resultado de las diferencias entre las cargas del silicio (Si: 4+) y el aluminio (Al: 3+), se genera por cada átomo de aluminio una carga negativa en exceso, que es neutralizada por los cationes de compensación para mantener la neutralidad eléctrica de la red cristalina. Este tipo de estructura microporosa hace que las zeolitas presenten una superficie interna extremadamente grande en relación con la superficie externa de sus cristales; esa misma estructura se puede llenar físicamente de gases y agua, confiriéndole la propiedad de adsorber otras sustancias (18-21).

En principio se ha señalado que el agua puede ser eliminada, sin que la red cristalina se destruya. Sin embargo, los cationes no tienen la libertad a menos que se les sustituyan por su equivalente electroquímico, ya que es necesario neutralizar la carga aniónica de la red; y es lo que le confiere la propiedad de intercambio iónico a las zeolitas (18-21).

Las zeolitas pueden interactuar con los iones de hidrógeno o de hidroxilo presentes en solución y como consecuencia, pueden ocurrir ciertos fenómenos físico-químicos tales como: adsorción, hidrólisis de los sólidos, degradación, reacción *buffer*, disolución, e incluso transformación de fase (19-21). Como sólidos porosos con una importante superficie interna, ofrecen la posibilidad de incorporar y adsorber moléculas o iones en su enrejado abierto y sobre su superficie. La presencia de surfactantes sobre su superficie externa induce e incrementa la co-adsorción de diferentes moléculas orgánicas.

Las zeolitas se han clasificado según su origen en: naturales y sintéticas.

Zeolitas sintéticas son las producidas industrialmente a partir de reactivos químicos. Para producir las de primera generación se emplearon silicato de sodio, aluminato de sodio e hidróxido de sodio en diferentes proporciones, que en determinadas condiciones hidrotermales, dieron lugar a varios tipos de zeolitas. Las siguientes generaciones emplearon otras bases como agentes "templantes" o plantillas de la estructura, así como otros elementos diferentes al aluminio y al silicio.

Las zeolitas naturales son las que por lo general se encuentran formando parte de yacimientos de origen volcánico que evolucionaron en diferentes ambientes, los de mayor interés son los yacimientos sedimentarios por el elevado contenido de zeolitas, lo que permite su explotación minera rentable (22,23).

En Cuba, existen grandes reservas de zeolitas naturales, consideradas dentro de las más importantes en el mundo. El yacimiento de Tasajeras (sedimentario) en la provincia de Villa Clara, es el de mayor importancia por su extensión y calidad del mineral (23). Se ha observado que contiene grandes cantidades de Clinoptilolita y de Heulandita, dos zeolitas semejantes que solo se diferencian entre sí por presentar un átomo de aluminio más, la última.

Las zeolitas naturales se consideran una atractiva materia prima con una gran variedad de aplicaciones, sobre todo en la elaboración de medicamentos, (24-26). Por el contrario, las zeolitas sintéticas, aun cuando son elaboradas industrialmente en condiciones que reproducen un laboratorio de síntesis química, y tener un conjunto de utilidades importantes en la industria química del petróleo, no pueden utilizarse en la elaboración de medicamentos por los residuos de silicio y aluminio biológicamente activos, de elevada toxicidad, cationes que no están presentes en las zeolitas naturales elaboradas por la naturaleza durante millones de años.

Modificación de las zeolitas.

En las zeolitas, los procesos de adsorción ocurren, principalmente, en la superficie interna de los microporos o en la superficie externa de los cristales, en dependencia de la geometría y de las dimensiones de las moléculas orgánicas huéspedes (17-19).

En la búsqueda de nuevas aplicaciones farmacéuticas a escala industrial, se realizaron numerosos trabajos dirigidos primero a la utilización de las propiedades físicas y químicas de la zeolita natural tipo Clinoptilolita; luego a la obtención de nuevos materiales empleando a esta zeolita como materia prima, los cuales se basaron en la modificación estructural y superficial del mineral. Las modificaciones estructurales pueden llevarse a cabo mediante transformaciones hidrotérmicas, obteniéndose como resultados materiales convenientemente modificados desde el punto de vista de sus propiedades físicas y químicas. Uno de los cambios es la variación de los cationes de compensación en cuanto a tipo y contenido, lo que no siempre implica una alteración en el enrejado cristalino (24-26).

La obtención de nuevos materiales zeolíticos mediante la combinación de Ciclodextrinas con zeolitas (naturales o sintéticas), ha demostrado ser efectivo en la encapsulación de compuestos orgánicos, que incluyen productos farmacéuticos. Por otra parte, se han explorado modificaciones de las zeolitas con el empleo de surfactantes, los cuales actúan como agentes reguladores de las características superficiales de estas (24-26).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, y las propiedades físico-químicas de NZ (clinoptilolite natural purificada), en Cuba se han elaborado diferentes principios activos basados en esta zeolita, y en formas modificadas de la misma, para el tratamiento de diversas enfermedades. Ha demostrado su propiedad microbicida cuando es intercambiada con cationes Zn^{2+} y Ag^+ (5,6) Intercambiada con Fe^{2+} es un adsorbente selectivo de glucosa (10,11) y en su forma cálcica ha mostrado su acción hipocolesterolémica en ensayos con animales de experimentación.

NZ ha sido también evaluada como matriz para la liberación de fármacos (25).

Los agregados de surfactante adsorbidos en superficies sólidas son capaces de solubilizar otras moléculas dentro de su estructura, análogo a las micelas en disolución. Este fenómeno se conoce en la literatura como adsolubilización, o co-adsorción. Diferentes materiales modificados con surfactantes han sido empleados para la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos en aguas de desechos, en la adsorción de micotoxinas y en la preparación de fertilizantes de liberación lenta, entre otras aplicaciones. En la literatura se reporta además el uso de materiales modificados por la

adsorción de surfactantes para la incorporación de fármacos (25). Esta aplicación ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica debido a que muchos fármacos son poco solubles en agua. A pesar de que las zeolitas naturales presentan excelentes propiedades como adsorbentes y la mayoría son inocuas al organismo humano, se encuentran muy pocos reportes en la literatura en cuanto al empleo de las mismas en la co-adsorción de surfactantes y fármacos.

1.3. La Clinoptilolita

La Clinoptilolita es la más abundante de las zeolitas naturales. De acuerdo con la clasificación de Breck (20), se encuentra en el grupo estructural perteneciente a la familia de la Heulandita. A temperatura ambiente es un cristal monolítico, isoestructural, con un cierto predominio de los cationes: sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}) y potasio (K^+).

La Clinoptilolita natural purificada, tanto en su forma natural como modificada, ha demostrado tener efectividad en el tratamiento de diversas afecciones debido a las propiedades adsorbentes y de intercambio iónico (6-8). Los resultados de los estudios de toxicidad han confirmado que esta zeolita no produce daño biológico (9) y su estabilidad durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, en comparación con la de sus análogas sintéticas, ha permitido la elaboración de varios principios zeolíticos activos.

Cabe señalar que los minerales zeolíticos se descomponen en medio ácido, sin embargo, esto no se ha observado con la Clinoptilolita, ya que la misma es estable en este medio ácido, según los trabajos de A. Rivera (24, 26).

Las zeolitas solo son solubles en ácido fluorhídrico. Otros ácidos como el sulfúrico (H_2SO_4) y el clorhídrico (HCl) atacan a la estructura produciendo extracciones parciales de Al y Fe. Sin embargo, frente al HCl estomacal se ha demostrado que tanto NZ (zeolita de partida para obtener FZ) como FZ son resistentes y producen escasa modificación de la estructura de la clinoptilolita (7).

Un nuevo medicamento con propiedades antiácidas que se denomina Neutracid ha sido desarrollado utilizando clinoptilolite natural purificado NZ. El nuevo producto antiácido se formuló como una tableta de mascar consistiendo en la interacción directa de este con el jugo gástrico. Los estudios farmacológicos mostraron efecto neutralizante del exceso de

HCl presente en jugos gástricos sintéticos y naturales. El efecto neutralizante de NZ clinoptilolite es producido por el cambio del protón y la hidrólisis de especies presentes en la zeolita. La composición química y la estructura de la Clinoptilolita – Heulandita de NZ no se varió significativamente después de la interacción con el jugo gástrico (7).

Los exámenes clínicos han demostrado la efectividad del Neutacid para aliviar los síntomas de hiperacidez gástrica en pacientes afectados de dispepsia gástrica y las úlceras duodenales gástricas. Los pacientes sometidos a estudios clínicos no refirieron efectos secundarios como estreñimiento o rebote ácido porque la estructura de pepsina en el jugo gástrico permaneció estable. El pH del jugo gástrico se mantuvo por debajo de 4 confirmado por la prueba farmacológica DE50 (7).

Mumpton (27), en 1960, investigó detalladamente la zeolita natural Clinoptilolita y comprobó que la misma posee un alto contenido de silicio y más cationes monovalentes que divalentes.

Existen dos fórmulas simplificadas de la Heulandita y la Clinoptilolita según Ming y Mumpton (21,27): $\text{Ca}_4\{\text{Al}_8\text{Si}_{28}\text{O}_{72}\} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{Na}_3\text{K}_3)\{\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}\} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ respectivamente. Representada en la Figura 1.

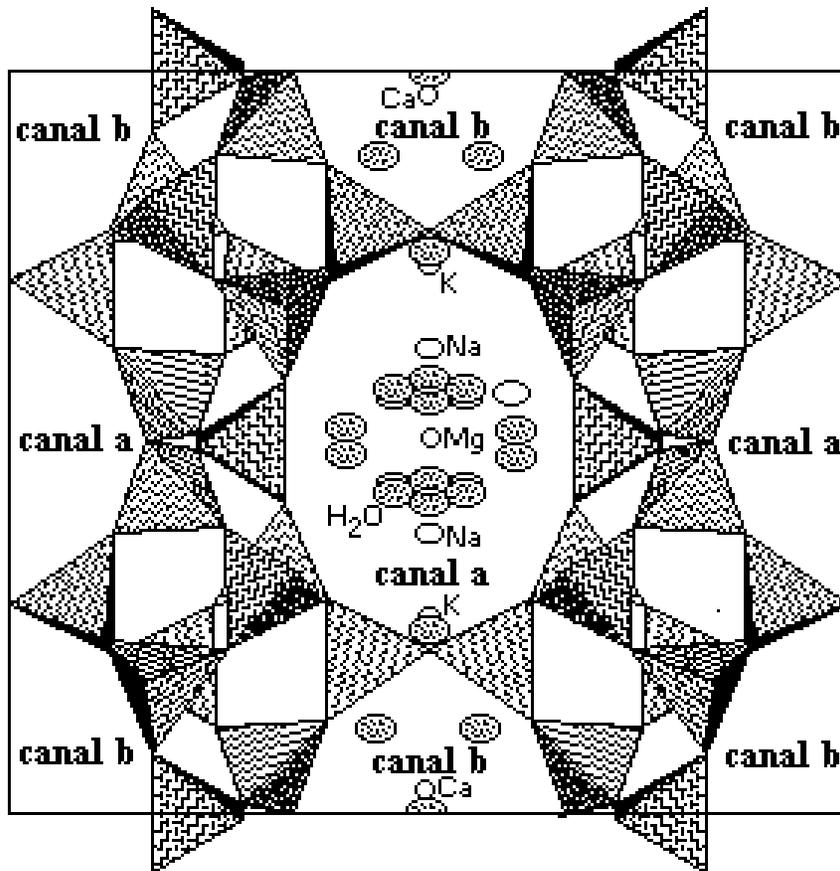


Figura 1. Sitios catiónicos de la clinoptilolita donde solo se observan los canales a y b según Bisch (28).

Los estudios realizados con la Clinoptilolita del yacimiento Tasajeras por Rodríguez-Fuentes (1987) demostraron que en este mineral existe cierto predominio de los cationes Na, Ca²⁺ y K. La clinoptilolita es un cristal monoclínico isoestructural a temperatura ambiente (28).

Un aspecto importante en la mayoría de las zeolitas naturales es su carácter hidrofílico. Por ejemplo, en el caso de la Clinoptilolita y la Mordenita hay alrededor de 21 y 24 moléculas de agua por celda unidad, respectivamente (24).

La capacidad o propiedad de intercambio catiónico de una zeolita es una función del grado de sustitución de Al³⁺ y Fe³⁺ por Si⁴⁺ en el enrejado tetraédrico. En la medida en que la sustitución sea mayor, se necesitará más cantidad de cationes para mantener la electroneutralidad de la red, lo cual generaría un aumento en la capacidad de intercambio.

El comportamiento de intercambio iónico depende de otros muchos factores, entre los que sobresalen la configuración y las dimensiones de los canales (21).

1.4. Aplicaciones de la Clinoptilolita en medicina.

Las aplicaciones de las zeolitas naturales en la medicina de los seres humanos están fundamentadas en los resultados encontrados en su empleo en la nutrición y la salud animal. La más utilizada para estos fines ha sido la Clinoptilolita. Se ha observado que la incorporación de Clinoptilolita natural en la dieta de las aves, reduce el efecto negativo de "transito rápido" (diarrea) producido por las micotoxinas segregadas por hongos que contaminan los granos de los alimentos. Esta infección conduce a una significativa pérdida de peso del animal por la malnutrición y la muerte. La Clinoptilolita adsorbe las aflatoxinas y ocratoxinas, así como favorece el restablecimiento de los electrolitos y disminuye la pérdida de agua (29).

Existen varios trabajos que abordan el uso de las zeolitas naturales con fines terapéuticos; en general ellas son utilizadas como suplementos dietéticos, adsorbentes de toxinas y metales pesados, por lo que sus efectos farmacológicos se continúan estudiando. Las investigaciones desarrolladas han demostrado que las mismas poseen propiedades biológicas y una alta estabilidad química y física en su interacción con el medio biológico; también se ha comprobado una alta especificidad en algunos materiales derivados de la Clinoptilolita (18).

Estudios realizados en animales de experimentación, han reportado el uso efectivo de la Clinoptilolita en el tratamiento del cáncer, así como su posible mecanismo de acción (30). Se ha reportado también el efecto de algunas zeolitas en la detoxificación y restauración de la motilidad celular en algunos modelos de organismos y el hecho de que pudieran ser utilizadas como asistentes para vacunas y agentes antibacterianos (31).

Galindo y colaboradores (32) realizaron un estudio para evaluar la actividad de la Clinoptilolita natural en el rumen bovino. Ellos encontraron que la misma ejercía un efecto tampón al estabilizar la flora bacteriana.

Por otra parte, Álvarez y colaboradores (33), mostraron el posible efecto protector de la Clinoptilolita sobre la mucosa gástrica al encontrar que cuando esta se le suministraba a

las ratas, 30 minutos antes de inducirles lesiones gástricas con etanol, se reducía la severidad de las lesiones; observaron además, una disminución significativa de la acidez a nivel estomacal. Estos resultados indicaron la posible utilidad de la Clinoptilolita, tanto en animales como en humanos, en el tratamiento de afecciones del tracto gastrointestinal que involucran, entre otras, hiperacidez, gastritis y úlceras gástricas (7, 8,12).

El estudio realizado por González y colaboradores en ratas alimentadas con dietas que contenían 2,5 %, 5% y 10 % de Clinoptilolita, durante 90 días, demostró que la ingestión del mineral producía un incremento de la actividad proteolítica gástrica, así como de las potencialidades digestivas al nivel del intestino delgado en comparación con algunos carbohidratos de la dieta (Registro de Medicamentos No. 0823, 1995.) (34).

Por otra parte, Tillán y colaboradores realizaron ensayos de toxicidad subcrónica de la Clinoptilolita natural del yacimiento Tasajeras y llegaron a la conclusión de que la ingestión prolongada de esta zeolita, evidentemente no provocó toxicidad en los animales de estudio, bajo las condiciones ensayadas. En: (Registro de Medicamentos No. 0823, 1995.) (35).

En el laboratorio de Ingeniería de Zeolitas, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE), de la Universidad de La Habana, en colaboración con algunas instituciones médico-farmacéuticas del país, se desarrolló para uso humano, un nuevo producto antidiarreico denominado Enterex (8,12), basado en las propiedades de adsorción y de intercambio iónico de la Clinoptilolita natural purificada. Los estudios microbiológicos, farmacológicos y clínicos, demostraron la eficacia de este producto en el tratamiento de enfermedades diarreicas agudas de diferentes etiologías a partir de una dosis relativamente baja, por lo que se ha reportado como un antidiarreico inespecífico ((8,12).

Otro estudio realizado con el Enterex demostró que este no presenta interacción con la Tetraciclina ni con el Cloranfenicol, medicamentos comúnmente utilizados en la terapia del cólera. El Enterex resultó ser el primer medicamento registrado por el CECMED que utiliza como principio activo una Clinoptilolita natural (36).

Cuatro estudios clínicos se realizaron empleando las tabletas de Enterex en el tratamiento de enfermedades diarreicas: 1) estudio de efectividad de Enterex en 30 pacientes

voluntarios con diarrea inespecífica; 2) uso de Enterex en la terapia de enfermedades diarreicas agudas. Estudio etiológico; 3) Enterex en la terapia de la enfermedad diarreica aguda resultado de intoxicación alimentaria; y 4) Enterex en la terapia de la enfermedad diarreica aguda en pacientes diabéticos con diarrea neuropática. Estudio comparativo con el Difenoilxilato de atropina (8,12).

En los tres primeros estudios clínicos, se observó la recuperación de la totalidad de los pacientes tratados en tiempos inferiores a las 36 horas de tratamiento, con la desaparición no solo de las diarreas, sino también de los síntomas acompañantes.

En el estudio de terapia de los pacientes con diarrea neuropática, se observó una recuperación del 89 % de los pacientes frente al 75 % lograda en los pacientes tratados con Difenoilxilato de atropina. Con el Enterex se pudo suministrar una segunda dosis sin efectos secundarios, algo que no puede prescribirse con el derivado de la atropina (12).

Para los pacientes diabéticos se podría disponer de varios productos, tales como: el antidiarreico (Enterex), el hipo-colesteremiante (Colestina), la crema natural de zeolites + cinc (ZZ), el suministrador de cinc (ZZ: natural zeolites + zinc), y el anti-hipeglucemiante (FZ: Fe²⁺-Clinoptilolita) (8, 37, 38).

Finalmente, la utilización de materias primas naturales en la producción de nuevos productos farmacéuticos, con alto valor médico social, es un trabajo prometedor y complejo, por la necesidad de garantizar que se cumpla estrictamente con los requerimientos de calidad normados por agencias nacionales e internacionales

La Colestina

La Colestina es un producto zeolítico obtenido a partir de la transformación hidrotérmica de la Clinoptilolita natural purificada con cloruro de calcio. Los resultados de los estudios en animales de experimentación utilizando Colestina demostraron una disminución importante en las concentraciones de colesterol total en plasma (20 %) después de 45 días de tratamiento, lo que evidenció la acción hipocolesterolemica de este producto (37). La combinación de Colestina con Policosanol (PPG) en los animales, provocó una reducción adicional en las concentraciones de colesterol total hasta del 25 %. Este efecto se observó también en animales alimentados con una dieta rica en colesterol, donde se

verificó que la Colestina puede proteger a dichos animales del desarrollo de procesos arteroscleróticos (38).

Uso de otras zeolitas modificadas

Dentro de las múltiples variaciones que se pueden provocar en el entorno iónico de las zeolitas, se encuentra la incorporación al mineral de iones de zinc, el cual presenta una reconocida actividad antimicrobiana. De hecho, existen numerosas patentes que protegen a los productos zeolíticos (sintéticos) que contienen en su estructura cinc o plata, para ser utilizados con fines antimicrobianos en la industria farmacéutica (39,40). Sin embargo, ninguna de estas patentes ha sido aplicada en la práctica médica debido a la elevada toxicidad que presentan las zeolitas sintéticas.

Cabe señalar, que no existen reportes en la literatura del uso de zeolitas naturales cargadas con cinc en humanos, a pesar de que estas no ofrecen riesgos. Este tipo de zeolita es el resultado de la transformación hidrotérmica de zeolita natural con solución de sulfato de cinc (zeolita natural + zinc) (39). Los ensayos microbiológicos han confirmado la amplia actividad bactericida de este producto (40).

La zeolita natural + zinc ha sido llevada a dos formas farmacéuticas: tabletas vaginales y crema dérmica, con una confirmada efectividad y sin evidencias de toxicidad. Los tres estudios clínicos realizados con las tabletas vaginales de zeolita y zinc al 10 % demostraron una recuperación superior al 80 % en las pacientes con infecciones vaginales inespecíficas, superior a la recuperación observada en las pacientes tratadas con tabletas vaginales de Nistatina y de Metronidazol (41,42).

Los resultados del estudio experimental, prospectivo, de corte longitudinal, realizado utilizando la crema compuesta por zeolita y zinc al 10 % en la cura local de 47 pacientes escogidos al azar, que presentaron quemaduras dérmicas e hipodérmicas con menos de 24 horas de evolución y con un pronóstico de vida entre leve y menos grave, demostraron que todas las lesiones dérmicas de tipo A lograron la cicatrización antes de los 10 días y en las dérmicas de tipo AB cicatrizaron 22 de los 24 pacientes antes de los 15 días. Se observó que se logró la formación precoz de un tejido de granulación útil en todas las quemaduras hipodérmicas, y no se apreciaron signos clínicos de infección local, ni reacciones adversas en los casos tratados (41). Esta recuperación de pacientes con

quemaduras reprodujo los resultados alcanzados antes en el tratamiento de 22 pacientes con pie diabético neuroinfeccioso, quienes sanaron sus úlceras y se recuperaron totalmente sin necesidad de un tratamiento quirúrgico (41).

La acción microbicida de este mineral también se observó cuando se utilizaba en agua potable contaminada con *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Se han diseñado sistemas de purificación de agua para consumo humano, como una alternativa de hervir el agua, pues el zinc liberado por la zeolita natural + zinc elimina totalmente varios microorganismos patógenos como el *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa*, *Leptospira interrogans*, *Aeromona hydrophila*, *Plesiomona shigelloides*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae* y los quistes de *Giardia lamblia*, todos muy dañinos para la salud humana (39-41).

Resultados *in vitro* obtenidos por Rodríguez-Fuentes confirman (40) a la zeolita natural + zinc, como un suministrador de iones zinc de acción controlada y prolongada para el tratamiento de patologías relacionadas con las deficiencias de zinc, tales como diabetes, ataxia, enfermedad de Wilson, entre otras.

En Cuba se han desarrollado tres productos zeolíticos antiácidos, que son:

1. El elaborado a partir de la Clinoptilolita natural purificada y denominado "Neutacid", cuya presentación comercial fue en forma de tabletas masticables de 900 mg. Este producto mostró gran éxito tecnológico y clínico, lo que le permitió ser aprobado para su uso en humano.
2. El obtenido a partir de la transformación hidrotérmica de la zeolita natural con una solución de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), cuyo producto final se denominó "Neutacid M", con una presentación comercial en forma de suspensión.
3. La zeolita natural tratada con una solución de carbonato de sodio, cuyos estudios de capacidad de neutralización realizados en presencia de jugo gástrico sintético y natural demostraron el efecto antiácido de estos productos (7,39-42).

1.5. Zeolita natural purificada (NZ)

La zeolita natural purificada es una mezcla de alrededor de un 70 % de clinoptilolita-heulandita, 5 % de mordenita, 15 % y 10 % de cuarzo. Esta zeolita natural cumple con los

requerimientos de la Norma Cubana NC 625: 2008 para ser utilizada en la Industria Médico- Farmacéutica (9), la misma presenta Certificado de Calidad y control microbiológico para demostrar esterilidad.

1.6. Zeolita natural intercambiada Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ), como adsorbente de carbohidratos. Desarrollo y caracterización de FZ.

Con vistas a la obtención de un medicamento que ayude al control metabólico de los pacientes diabéticos, se ha desarrollado un nuevo principio activo zeolítico que posee propiedades adsorptivas de glucosa, denominado FZ (Fe²⁺-Clinoptilolita). Este es un producto zeolítico que disminuye preferentemente la concentración de glucosa en solución, estos estudios mostraron que posee una alta preferencia a la adsorción de glucosa frente a otros carbohidratos como la sacarosa y la fructosa.

El FZ fue obtenido por medio de la transformación hidrotérmica de NZ (clinoptilolita natural purificada) con una solución de sulfato ferroso de calidad farmacéutica, controlando parámetros como concentración, temperatura, presión y pH. Esta propiedad no se ha reportado con anterioridad en una zeolita natural.

Fe²⁺-Clinoptilolita posee una nueva conformación de los átomos y agregados moleculares en sus cavidades, que le otorga una selectividad para la captura de glucosa en solución; los estudios *in vitro* llevados a cabo por Concepción Rosabal han demostrado que la glucosa no se libera fácilmente de este producto (43-45), avalado por los resultados de difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja (26,46).

Desarrollo y caracterización del “Fe²⁺-Clinoptilolita”.

La presencia del FeSO₄ como fase no cristalina (probablemente en forma de conglomerado (*cluster*) fue demostrada por los ensayos de reflectancia difusa en el infrarrojo, en espectros Mössbauer de FZ y la respuesta dieléctrica de FZ atribuidos a la existencia de dos formas del hierro intercambiado en esta zeolita natural (46).

Papel del Fe²⁺ incorporado a Fe²⁺-Clinoptilolita en el efecto antihiper glucemiante.

Concepción Rosabal en 1997 (45) reportó un resultado empírico que establece el papel que tiene el hierro incorporado a la zeolita natural purificada en la adsorción de glucosa en solución. Cuando se lava la Fe²⁺-Clinoptilolita con una solución ácida ocurre una extracción parcial del hierro y el aluminio estructural (46).

También los lavados con soluciones básicas son capaces de extraer hierro de la Clinoptilolita natural, cuyo proceso se acompaña de una oxidación del hierro incorporado en los sitios de intercambio. La muestra de zeolita natural purificada, que posee hierro en su estructura y en sitios de intercambio presenta niveles de adsorción de glucosa mayores (28%) que las muestras lavadas con soluciones ácidas y básicas. La Fe^{2+} -Clinoptilolita presentó una adsorción de (33%) (45).

Estos resultados demostraron la importancia del hierro incorporado a la zeolita natural en la adsorción de glucosa en solución, por lo que afirmaron que el Fe^{2+} es quien desempeña el papel crucial en la activación de la superficie adsorptiva de FZ frente a la glucosa.

Cinética de adsorción de carbohidratos por Fe^{2+} -Clinoptilolita.

En los estudios de Concepción Rosabal se determinaron las curvas de las cinéticas de adsorción en fase líquida de sacarosa, glucosa y fructosa en Fe^{2+} -Clinoptilolita.

El estudio polarimétrico de la adsorción de estos carbohidratos en fase líquida por FZ, permitió calcular el porcentaje de retención de cada uno de estos carbohidratos por Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ), que fueron de 36% para la glucosa, 10% para la fructosa y 13% para la sacarosa. Estos valores evidencian la mayor afinidad de la glucosa por FZ y se observó además cómo a pesar de ser la sacarosa un disacárido, se adsorbe más que la fructosa. Se demostró así la marcada selectividad o afinidad que posee la Fe^{2+} -Clinoptilolita ante la glucosa, aspecto interesante no reportado con anterioridad en zeolitas naturales (45).

Concepción Rosabal en sus experimentos determinó también la cinética de adsorción y desorción de glucosa por la Fe^{2+} -Clinoptilolita, durante dos horas, encontró que la adsorción de glucosa se mantenía en ascenso durante la primera hora de intercambio, y a partir de ese momento se observaba una meseta en la curva que indicaba la saturación de la zeolita por la glucosa. La curva de desorción mostró la pequeña cantidad de glucosa que se libera al medio, lo cual era indicativo de que el enlace entre la glucosa y la Fe^{2+} -Clinoptilolita era fuerte, una vez captada la glucosa no se libera fácilmente (10, 11, 43, 44). Estos elementos avalados en los estudios *in vitro* son los que soportan la propuesta de que FZ es un nuevo material zeolítico candidato a principio activo para elaborar un fármaco antihiper glucemiante (42-45).

Las curvas cinéticas de adsorción en fase líquida de sacarosa, glucosa y fructosa en Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) publicadas por Concepción Rosabal se presentan en la figura 2 y 3 (45).

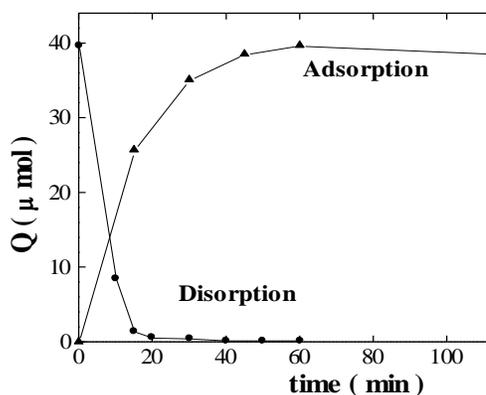


Figura 2. Curvas cinéticas de adsorción y desorción de glucosa en FZ (45).

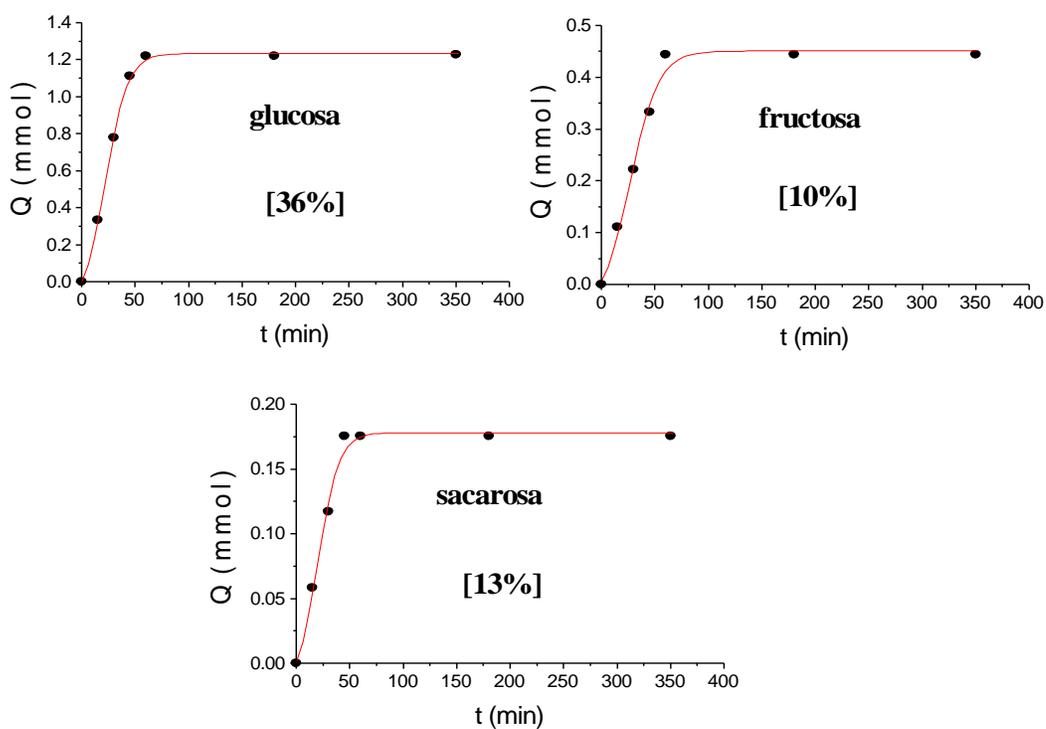


Figura 3 Curvas cinéticas de adsorción de Glucosa, Fructosa y Sacarosa por FZ. Donde Q (mmol) es la cantidad de sustancia adsorbida y t (min.) es el tiempo de la reacción. Entre corchetes se reportan los porcentajes de retención de cada uno de los sacáridos (45).

1.7. Diabetes Mellitus. Generalidades.

La Diabetes Mellitus (DM) se caracteriza por una hiperglucemia crónica y se acompaña de enfermedades micro y macro vasculares que causan ceguera, fallo renal y daño en el sistema nervioso; además de un desarrollo acelerado de la aterosclerosis que incrementa el riesgo de infarto del miocardio, isquemia cerebral y amputaciones de miembros inferiores (1,2).

La DM se describe como un síndrome endocrino-metabólico heterogéneo en el que los factores genéticos desempeñan una función esencial conjuntamente con la acción de agentes virales, inmunológicos y ambientales (2).

La DM está caracterizada por dos grandes tipos de manifestaciones (2):

1- Síndrome metabólico, en el que aparece primeramente la hiperglucemia, alteraciones del metabolismo lipídico y de las proteínas, derivado de un déficit parcial o absoluto de insulina o de la función de la misma.

2- Un síndrome vascular que puede afectar a todos los órganos pero sobre todo el corazón, la circulación cerebral, renal, la retina y la circulación periférica.

Epidemiología.

La DM se presenta con elevada frecuencia en Cuba y el resto del mundo, que por su naturaleza epidemiológica se ha convertido en un serio problema de la salud pública en el ámbito internacional. Hasta el momento actual esta enfermedad no es curable aunque es sensible a un buen control (3).

Alrededor de 250 millones de personas en todo el mundo sufren de diabetes, y se pronostican 300 millones para el 2025. América Latina no escapa a este fenómeno con una proporción importante de diabéticos, se estiman 13 millones de personas en América Latina y el Caribe y se espera que alcance los 65 millones en el 2025 (3). Hasta la fecha Cuba tiene una situación similar (2).

Con respecto a la mortalidad, la DM ha ocupado en los últimos años el octavo lugar entre las causas de muerte en Cuba, con una tasa que decreció en la década de los noventa para comenzar a incrementarse de nuevo a partir del 2003, la tasa de mortalidad ajustada descendió de 19,4 por 100 000 en 1990 a 9,7 por 100 000 en el 2002, a partir del 2003

comienza a ascender (10,5 por 100 000) llegando a 11,8 en el 2007, cuando ocupó la octava posición como causa de muerte y así se mantiene en la actualidad (1,4).

En lo que respecta a América Latina y el Caribe, Cuba ha sido considerado uno de los siete países más afectados de la región (1-3, 47,48).

Criterios diagnósticos de Diabetes Mellitus. Propuesta de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (2).

Los valores de referencia de glucemia en humanos oscilan en las personas sanas entre 4 y 6 mmol/L o su equivalencia en miligramos, 72mg/dL a 90 mg/dL, valores por encima de lo referido requieren de un análisis del médico.

El diagnóstico de la diabetes incluyó recientemente un nuevo criterio con ciertas ventajas sobre los anteriores pero aún no disponible en algunos países por ser más costoso. Estos incluyen:

1. Hemoglobina Glucosilada (HbA1C) mayor o igual que 6, 5%.
2. Síntomas típicos y una glucemia igual o superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) en cualquier momento del día (al azar).
3. Glucemia en ayunas igual o superior a 126 mg/dL (ó 7,0 mmol/L).
4. Glucemia igual o superior a 200 mg/dL (ó 11,1 mmol/L) a las 2 horas en la Prueba de Tolerancia a la Glucosa (PTG). Los valores entre 7,8 y 11 señalan un trastorno del metabolismo de la glucosa previo a la Diabetes.

Para convertir la cifra en mg/dL a mmol/L se divide esta cifra entre 18 y el resultado es este valor en mmol/L.

Los valores de glucemia en ayunas mayor o igual a 5,6 mmol/L y entre 7,8 -11,1 mmol/L a la segunda hora de la PTG-O son reconocidos como estados prediabéticos (Glucemia en ayunas alterada y Tolerancia a la glucosa alterada) y representan estados de mayor riesgo de padecer diabetes y enfermedades cardiovasculares,

Regulación de la glucemia: (2).

Cuando el estado general del paciente es bueno se habla de un control clínico.

El control bioquímico habla de las variables hematológicas y en especial de la glucemia, la Hemoglobina glucosilada, la glucemia postprandial y la glucosuria.

El control glucémico intensivo previene y retrasa la aparición de las complicaciones vasculares como fue demostrado en el Ensayo para el Control de la Diabetes y sus Complicaciones (DCCT: Diabetes Control and Complications Trial) (47,48) y el Estudio Prospectivo de la Diabetes del Reino Unido (UKPDS: U.K. Prospective Diabetes Study). (49-51).

1.7.1 Tratamiento medicamentoso de la Diabetes Mellitus tipo 2: los antidiabéticos orales (ADO).

La educación diabetológica es la base del tratamiento en el paciente diabético. La terapia inicial incluye cambios en el estilo de vida, a través de la actividad física programada y la dieta, adecuadas según las características individuales del paciente; para lograr el peso corporal adecuado, el control metabólico y evitar las complicaciones. Si lo anterior no da resultado se pasa a la terapia farmacológica con los antidiabéticos orales (ADO) y la insulina (2,3). Los antidiabéticos orales disponibles tienen variados mecanismos de acción: (estimulan la secreción de insulina, mejoran la resistencia a la insulina, modulan la absorción de carbohidratos a nivel intestinal, favorecen la actividad de las incretinas, entre otras) (2,3). La educación diabetológica es la base del tratamiento en el paciente diabético. La terapia inicial incluye cambios en el estilo de vida, a través de la actividad física programada y la dieta, adecuadas según las características individuales del paciente; para lograr el peso corporal adecuado, el control metabólico y evitar las complicaciones.

Medicamentos que estimulan la secreción de insulina.

a). Sulfonilureas. Ejemplos de este tipo de medicamento son la Tolbutamida (Diabetón), Glibenclamida, Clorpropamida, Glicazida (Diamicrón), Glipizida, Gliquidona, Glimepirida (Amaril), Tolazamida y Gliburida. Su principal mecanismo de acción es estimular la secreción de insulina preformada en el páncreas (49).

b). Meglitinidas. Entre ellas están la Repaglinida y la Nateglinida; Son secretagogos de insulina de acción rápida en presencia de alimentos. Estos medicamentos se unen al receptor de sulfonilureas pero por un sitio diferente con un mecanismo adicional de *fast in* y *fast out* con lo que se consigue una respuesta más rápida y eficiente. Tienen como

ventajas que logran actuar sobre las glucemias postprandiales y por su vida media menor tienen menos riesgo de hipoglucemias (52).

Medicamentos que aumentan la sensibilidad a la insulina.

a) Biguanidas (Metformina). Es el fármaco de elección en pacientes con sobrepeso u obesidad. No produce aumento de peso y es el único antidiabético oral que demostró una reducción de las complicaciones macrovasculares a largo plazo (51,53).

b) Glitazonas o Tiazolidinedionas. (Rosiglitazona, Pioglitazona).

Su acción se produce aumentando la captación y el uso de glucosa en músculo y tejido graso, por lo que aumenta la sensibilidad de la insulina. La Rosiglitazona aumenta el colesterol total, el de las LDL y el de las HDL, mientras que la Pioglitazona solo aumenta el C-HDL y reduce los triglicéridos, su efectividad es inferior a la de las Sulfonilureas y la Metformina (54-55).

1.8. Medicamentos que modulan la absorción de carbohidratos a nivel intestinal. La Acarbosa como modelo antihiper glucemiante.

Estos medicamentos son Inhibidores de la enzima alfa-glucosidasas (Acarbosa, Miglitol), por lo que los polisacáridos no son transformados en oligo y monosacáridos que son los que pueden absorberse fácilmente (56-58).

Descripción de la Acarbosa. (60-64)

La Acarbosa es una pseudotetramaltosa (seudo oligosacárido) de origen microbiano, que se obtiene por bioingeniería (59). Es el representante más antiguo de la familia de los inhibidores competitivos de las alfa glucosidasas. Estas enzimas están localizadas fundamentalmente en el borde de las vellosidades del intestino delgado, y su inhibición produce un retraso en la digestión de los carbohidratos cuya absorción se prolonga. Esto significa que la elevación postprandial de la glucemia se reduce y se prolonga, pues no produce mala absorción (64-67).

Los estudios farmacológicos sugieren que la acción de la Acarbosa (68-72) al inhibir las enzimas alfa-glucosidasas intestinales, actúa sobre la digestión de los hidratos de carbono y reducen las concentraciones de glucosa en sangre así como las hormonas que son liberadas después de la ingestión de alimentos. Además actúa sobre el eje entero

pancreático, provocando una disminución en la secreción de la gastrina, la pancreocimina y el enteroglucagón y una prolongación en la acción de la motilina (73-76). Todos estos efectos son reversibles e implican un enlentecimiento en la absorción de la glucosa tanto en personas saludables como en las diabéticas. Además reducen las concentraciones de lípidos en sangre (75-80).

En un estudio sobre los efectos de la Acarbosa en el tratamiento de pacientes diabéticos, en el cual se le administró Acarbosa a 52 pacientes de tipo 2 por dos meses, se encontró una disminución de la glucemia postprandial de un 26%, en relación con el período precedente, también se redujeron los valores de: HbA1c (0,5-0,8%), glucosuria, triglicéridos y del peso corporal (81).

Farmacocinética: Aproximadamente un 2% de la dosis administrada se absorbe de forma inalterada en el tracto gastrointestinal, sin que ello produzca ningún efecto sistémico. Los productos absorbidos, después de la degradación por las enzimas digestivas y las bacterias intestinales, constituyen el 35% de la dosis administrada. Tanto la Acarbosa como sus productos de degradación absorbidos, se eliminan rápida y completamente por los riñones (82).

Indicaciones.

Los pacientes obesos, los que presentan un sobrepeso o una obesidad ligera de predominio abdominal, los intolerantes a los hidratos de carbono y los diabéticos de cualquier tipo, fundamentalmente los diabéticos tipo 2, son los más beneficiados con este tipo de tratamiento antihiper glucemiante.

Interacciones.

La Acarbosa puede potenciar los efectos hipoglucemiantes de los fármacos antidiabéticos, si la Acarbosa es administrada como segundo fármaco, los pacientes deberán ser monitoriados para evitar el desarrollo de episodios hipoglucémicos, reduciendo la dosis del agente antidiabético y/o de la Acarbosa.

Los cambios en los hábitos dietéticos y la pérdida de peso asociada a un tratamiento, pueden mejorar el control metabólico de los pacientes diabéticos obesos, efecto que puede ser aditivo a los de la Acarbosa y de otros fármacos antidiabéticos, por lo que puede ser necesario un ajuste de la dosis.

Reacciones adversa.

Con frecuencia se observa flatulencia y ruidos intestinales. Ocasionalmente, diarrea y distensión abdominal y con menor frecuencia, dolor abdominal que puede llegar a discontinuar el tratamiento en el 24% de los casos según algunos estudios. Estos síntomas gastrointestinales pueden ser de carácter grave y llegar a confundirse con síntomas de tipo íleo o con un íleo intestinal. En caso de que aparezcan molestias dolorosas intensas a pesar de observar la dieta, se deberá reducir la dosis de forma transitoria o permanente. En casos individuales se pueden producir reacciones cutáneas de hipersensibilidad como eritema, exantema y urticaria. Muy raramente se han notificado casos de hepatitis y/o ictericia (83).

1.9. Nuevos fármacos. Que favorecen la actividad de las incretinas.

Los análogos de la amilina (Pramlitide), análogos de las incretinas (Exenatide, Liraglutide) y los inhibidores de la dipeptidilpeptidasa (DDP-4) (Sitagliptina, Vildagliptina, Saxagliptina, Linagliptina) son los grupos de fármacos más modernos para el tratamiento de la diabetes y otros esperan por ser aprobados para su comercialización como los inhibidores del SGLT-2 (transportador de la glucosa dependiente del sodio 2) (84-86).

1.10. Insulina.

La insulinoterapia es el tratamiento de la diabetes de tipo 1, pero en los diabéticos de tipo 2 permite lograr los objetivos de control metabólico cuando no se logran con la dieta, el ejercicio y los ADO, no obstante existen situaciones en las que es imprescindible su uso (81).

Existen numerosos regímenes insulínicos por lo que se debe ajustar a aquel que sea más beneficioso para el paciente. También pueden combinarse con los antidiabéticos orales.

1.11. Terapia combinada.

La terapia combinada se basa en el aprovechamiento del efecto sinérgico de los diferentes mecanismos de acción de los fármacos. Además permite utilizar menores dosis

de los mismos, lo que puede reducir la frecuencia o gravedad de los efectos adversos y con una efectividad superior (87).

1.12. Fundamentación de la selección del biomodelo a emplear, el tamaño de la muestra y las dosis empleadas en el trabajo de tesis. (88, 89,90)

Las ratas, los perros y los conejos han sido ampliamente utilizados en los estudios farmacológicos donde se investigan medicamentos hipoglucemiantes y antihiperoglucemiantes (91,92), debido a que son susceptibles a la acción de estos medicamentos, además en gran medida el metabolismo de ellos es parecido al de los humanos (93-97).

La rata es la especie de roedor de mayor uso en farmacología y en la toxicología experimental, y es la recomendada por las principales agencias regulatorias, motivado por sus características biológicas que favorecen no solo los aspectos zootécnicos y el trabajo de laboratorio sino que poseen la ventaja del volumen considerable de información sobre la especie, su facilidad de reproducción y bajo costo han proporcionado una gran cantidad de información. La línea Wistar en particular es una de las más utilizadas en este campo, ya que se caracterizan por su rápido crecimiento y por ser dóciles y fáciles de manipular (98-104).

La rata es en general una de las especies de roedores más utilizadas en investigaciones farmacotológicas y la línea Sprague Dawley, presenta un bajo nivel de aberraciones cromosómicas espontaneas, por lo que constituye un biomodelo adecuado para realizar este estudio (105, 106, 108,109).

Números de animales utilizados.

En algunos estudios toxicológicos está establecido en el protocolo el tipo y número de animales a emplear. En estudios farmacológicos preclínicos se tiene en cuenta experiencias anteriores del efecto del medicamento y el mecanismo de acción del mismo, así como la sensibilidad del animal para utilizar la menor cantidad de animales, de la

especie más pequeña y económica posible y poder demostrar el efecto del medicamento (101, 102, 107,108).

Dosis utilizadas en los estudios.

La dosis utilizada en cada modelo se seleccionó basado en el estudio, efecto dosis-respuesta, estos estudios se realizan generalmente en especies de animales de experimentación que anteriormente se han sometido a pruebas de sensibilidad al medicamento durante un período de tiempo, para el cual el medicamento ejerce su acción, de manera tal que se puedan manifestar sus efectos (101, 102, 107,108).

Estudio dosis efecto de un medicamento.

La información que brinda esta prueba va a estar dada por el rango de dosis en que se obtiene un aumento del efecto de la sustancia a probar, sobre el parámetro bioquímico a medir, para lo cual se emplean varias dosis, partiendo de una mínima hasta dos dosis consecutivas con las que se obtenga un efecto similar, es decir, hasta la aparición de una meseta en la curva dosis – efecto.

En este estudio de dosis hemos utilizado ratas Wistar, especie relativamente fácil de manejar y que se ha utilizado con anterioridad en este tipo de trabajo (101, 102, 107,108).

La dosis efectiva media de un fármaco es la dosis a partir de la cual se observa el efecto deseado en el 50% de los individuos de una población estudiada (animales de laboratorio, humanos). Es la dosis que produce una disminución de la glucemia en una magnitud previamente escogida, por ejemplo: una disminución del 20%. Entonces, se cuenta el número de animales donde la reducción fue del 20% y eso se expresa en % en una ordenada que tiene una escala en unidades Probits, estando en la abscisa el logaritmo de las dosis o las dosis reales en escala logarítmica. El método de Litchfield y Wilcoxon (Método Probit), traza una recta de ajuste desde donde se obtienen los valores teóricos (esperados). Es uno de los más utilizados y se trabaja con Curvas Dosis-Respuestas (CDR). La linealización se lleva a cabo a partir de los datos generados en la curva dosis-respuesta (curva gradual) donde las áreas bajo la curva se transforman a una escala logarítmica y se construye una nueva curva ajustada (curva cuantil) por un programa

estadístico. La escala de Probits lo que hace es convertir la sigmoide en una recta, específicamente para corregir los valores extremos que están por debajo del 16% y por encima del 84%.

Las técnicas radioisotópicas.

Estas técnicas se caracterizan por ser muy útiles en los estudios de absorción y distribución de alguna sustancia en el organismo y poseer un alto nivel de confiabilidad, por lo que los resultados obtenidos en los ensayos realizados al FZ, en que se empleó glucosa marcada con ^{14}C son útiles para corroborar los resultados obtenidos en los estudios anteriores *in vitro e in vivo*. Por lo costoso de estas investigaciones y por el riesgo que el trabajo con estas técnicas conlleva, generalmente el número de animales con los que se trabaja es pequeño, así como la especie animal.

Modelo experimental de Diabetes.

La streptozotocina (STZ), inyectada por vía intravenosa provoca una destrucción de las células insulinosecretoras β de los islotes de Langerhans pancreáticos, como consecuencia de lo cual induce en el animal la aparición de una diabetes insulinoprivativa, sin ser insulino-dependiente, ya que las débiles cantidades de insulina secretadas son suficientes para evitar la muerte del animal. Se presenta una hiperglucemia mayor de 5mmol/L asociada a los síntomas de la diabetes (poliuria, polidipsia, hiperfagia y adelgazamiento) y a largo plazo aparecen las complicaciones asociadas (insuficiencia renal, trastornos cardiovasculares, etc.). Este modelo se caracteriza por una fuerte relación entre la alimentación y la glucemia y resulta útil para ser empleado en un estudio, donde se quieren conocer los efectos de un inhibidor de la absorción de carbohidratos (101, 102).

Estudios toxicológicos.

Los estudios toxicológicos y de seguridad de un producto son imprescindibles cuando se trata de un fármaco o producto natural que se desarrolla con fines terapéuticos, sobre todo para ser usados en pacientes, debido a que pueden implicar un riesgo potencial para

la salud o la vida de una persona, por lo que es importante identificar aquellos productos que presenten tales propiedades (88, 99,107).

La mutagénesis se refiere a las modificaciones del material genético, espontaneas o inducidas química o físicamente que afectan al individuo o a las células y que provocan una variación permanente y hereditaria de las generaciones siguientes de individuos o de células respecto a las precedentes ((88, 99,107).

Los conocimientos científicos actuales indican que numerosos productos poseen propiedades mutagénicas que implican un riesgo potencial para las generaciones futuras y un riesgo potencial de cáncer para la generación actual, por lo que es importante identificar aquellos productos que presenten tales propiedades.

Como FZ es un producto con potencial uso en la terapia humana debe pasar por estas pruebas.

Las pruebas *in vivo* por su naturaleza, tiene la ventaja de tener presente los procesos de absorción, distribución y excreción, los cuales no están presentes en los estudios *in vitro*. En los estudios *in vivo* el metabolismo es más relevante.

Conclusiones del capítulo.

Las demostradas propiedades adsorptivas del FZ, con una acción específica: adsorción selectiva de glucosa, pudiera ser empleado como principio activo de un producto antihiper glucemiante, útil en el tratamiento de pacientes diabéticos, obesos, con resistencia a la insulina y en el síndrome metabólico.

El efecto antihiper glucemiante de este producto pudiera ser comparado con el que produce la Acarbosa, que se emplea en el tratamiento de pacientes diabéticos.

FZ producto natural con posibilidades de uso clínico, de producción nacional y económico, su aplicación pudiera extenderse a nuestra población carente de un medicamento similar, lo que pudiera reportar un alto valor médico social.

CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.

Introducción al capítulo.

Las investigaciones que a continuación se presentan fueron diseñadas para demostrar las propiedades antihiper glucemiante de la Fe²⁺-Clinoptilolita, la inocuidad de este posible fármaco, así como su posible mecanismo de acción en el sistema digestivo, además para la comparación con otro producto de mecanismo de acción parecido y otros efectos que pueden estar relacionados con el uso del mismo. Los ensayos se llevaron a cabo en animales de laboratorio según los modelos experimentales establecidos por el Centro de Control Estatal para la Calidad de los Medicamentos (CECMED) de la República de Cuba.

2.1. Materiales.

Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ): Los lotes de FZ utilizados fueron obtenidos en la planta experimental del laboratorio de Ingeniería en Zeolitas Naturales del IMRE de la Universidad de La Habana, con un tamaño de partícula inferior a los 0,16 mm.

Su composición se observa en la tabla 1 y 2. El Fe²⁺-Clinoptilolita se obtuvo con Certificado de Calidad y control microbiológico (9).

Tabla 1. Composición de fases zeolíticas y otras fases minerales (%).

Tipo de Zeolita	Clinoptilolita- Heulandita-Mordenita	Cuarzo- Feldespato Mormorilonita-óxido Fe
Zeolita natural (NC 625: 2008)	60%	40%
FZ	78%	22%

Tabla 2. Composición química de FZ (% en peso).

Elementos mayoritarios	Zeolita natural (NC 625: 2008)	NZ (zeolita purificada)	FZ
SiO ₂	64-66	64,3	64,9
Al ₂ O ₃	10-12	10,18	11,8
Fe ₂ O ₃	1,2-1,5	1,8	4,9
MgO	0,3-0,9	0,7	0,6
CaO	2,5-6	3,3	2,8

Acarbosa.

Medicamento utilizado en los estudios de comparación con FZ, por su efecto antihiperglucemiante, se utilizó como fármaco de referencia y procede de los laboratorios Bayer (Barcelona, España).

Glúcidos marcados con isótopos radioactivos.

La actividad específica de los sacáridos marcados con ^{14}C que se administraron a los animales en los estudios fueron: Glucosa (actividad específica de 144 Bq/g de peso), sacarosa (actividad específica de 2851 ± 15 Bq/g de peso) y fructosa (de una fuente con actividad total de 9,25 MBq), la actividad específica suministrada a las ratas fue de 2726 ± 9 Bq/g de la solución de fructosa marcada. Todos de la firma Amersham International Center.

2.2. Animales de experimentación.

Los animales de experimentación empleados fueron:

- Ratas Wistar Cenp: SPRD.
- Ratones CENP: NMRI.
- Conejos Chinchilla.
- Perros Beagles.

Garantía de la Calidad y ética de la investigación en el trabajo con animales.

Para la liberación por la División de Aseguramiento de la Calidad de los animales, alimentos, el local, el personal y la documentación se tomaron como requisitos los siguientes aspectos:

Animales: se obtuvieron en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba), con Certificado de salud, y respondían a las solicitudes de peso edad y sexo.

Fueron acondicionados al ambiente experimental al menos 7 días antes del ensayo, una vez concluido este período de adaptación, se distribuyeron en los diferentes grupos de acuerdo al estudio a que fueron asignados.

Todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los comités internacionales para el cuidado de los animales de laboratorio y de acuerdo con las regulaciones nacionales establecidas para la experimentación animal como el "Codigo de buenas prácticas de laboratorio".del Centro de Toxicología Experimental (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, (CENPALAB).

Y las "Buenas prácticas de laboratorio y garantía de la calidad en ensayos toxicológicos". Ministerio de Salud Pública. República de Cuba. Resolución 152. 17 de septiembre de 1992 (108).

El cuidado y manejo de los animales fue realizado con personal calificado.

La supervisión fue efectuada por un médico veterinario con especialidad en animales de laboratorio.

Se utilizaron métodos alternativos para permitir vivir a los animales cuando existía la posibilidad.

Los animales fueron utilizados únicamente para producir la información necesaria para esta investigación. Se utilizó anestesia y no agentes paralizantes en las investigaciones en que se necesitaba tranquilizar al animal, para evitar el sufrimiento innecesario de los animales, siempre que fuera posible.

El sacrificio se efectuó mediante procedimientos seguros y confiables. Los animales fueron sacrificados al final del estudio con una sobredosis endovenosa de pentobarbital.

Siempre se tuvo en cuenta la valoración de los estudios por el comité de ética de la investigación del Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular

Alimentos: Con Certificado de Calidad. Dieta acorde a la especie EMO 1001 según lo establecido para los animales de laboratorio.

Locales de Ensayo: Los locales destinados a la estancia de los animales de experimentación, se mantuvieron bajo un ciclo alterno de luz y oscuridad cada 12 h y a una temperatura controlada entre 25-27 °C.

Los locales en los que se realizaron los estudios experimentales fueron:

- Bioterio del Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular.
- Laboratorio de Medicina Nuclear del INACV.

- Laboratorios de Toxicología del CENPALAB con sala protegida sometida a esterilización según el procedimiento de rutina establecido.
- Laboratorios de Toxicología del CENSA.
- Laboratorios de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Montpellier, Francia.

Personal:

Se empleó personal con experiencia en el trabajo con animales, declarado apto para trabajar en el lugar mediante control de salud.

Documentación: Todos los procedimientos fueron realizados respetando las normativas de los comités internacionales para el cuidado de los animales de laboratorio y de acuerdo con las regulaciones nacionales establecidas para la experimentación animal, en concordancia con las directivas y regulaciones establecidas en el "Proyecto de Código de Buenas Prácticas de Laboratorio" y en el "Código Práctico para el Uso de los Animales de Laboratorio" (108).

2.3. Metodología general.

Diseño de investigación: Experimental *in vivo*.

2.4. Flujo de la investigación:

Algunas pruebas previas *in vitro* mostraron que se adsorbía glucosa selectivamente en solución. Posteriormente en este trabajo se realizaron los estudios farmacológicos a Fe²⁺-Clinoptilolita en animales de experimentación, que dieron lugar a esta tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias de la Salud.

Con el objetivo de comprobar la propiedad de adsorción de glucosa por el la Fe²⁺-Clinoptilolita en condiciones semejantes a las naturales o próximas a las del sistema digestivo humano, se realizaron algunos ensayos en diferentes modelos experimentales.

- 1- Para evaluar el efecto de la administración oral de diferentes dosis de Fe²⁺-Clinoptilolita sobre los niveles de glucosa en sangre, y dosis única se utilizaron ratas Wistar y perros Beagles
- 2- Se realizaron estudios con glucosa, fructosa y sacarosa marcadas para profundizar sobre el mecanismo de acción del FZ.

3- Se comparó el efecto antihiperglucemiante del FZ con un fármaco de referencia, la Acarbosa, en perros Beagles.

4- Se evaluaron los posibles efectos pleiotrópicos o secundarios del Fe²⁺-Clinoptilolita sobre los niveles de colesterol y triglicéridos del plasma, así como sobre otros parámetros relacionados con la bioquímica de la sangre y la coagulación, en conejos y perros.

5- Se evaluó la toxicología aguda y la genotoxicidad del FZ., en ratones y ratas.

2.5. Obtención de las muestras de sangre.

Las extracciones de sangre en las diferentes etapas de cada experimento se realizaron siempre entre las 8.00- 9.00 am, después de 12 horas de ayuno. Para las determinaciones de la concentración de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero, las muestras de sangre se recogieron en tubos de centrífuga de cristal (sin anticoagulante). Para las determinaciones de las pruebas de coagulación se colectó la sangre en tubos de centrífuga plásticos que contenían citrato de sodio al 3,8% como anticoagulante (proporción sangre/anticoagulante: 9/1).

2.6. Técnicas empleadas.

Las determinaciones bioquímicas se hicieron de forma manual, mediante el empleo de las técnicas de laboratorio que se relacionan a continuación:

- El colesterol se determinó por el método enzimático colorimérico (CHOP-PAP) utilizando un juego de reactivos de la firma Boehringer-Mannheim (109).
- Se obtuvo las lipoproteínas de alta densidad (HDL) por precipitación selectiva con ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio utilizando un juego de reactivos de la firma Boehringer-Mannheim (110).
 - Los triglicéridos se determinaron por el método enzimático colorimérico (CHOP-PAP) con un juego de reactivo de la firma Menagent (111).
- El Tiempo de Protrombina se llevó a cabo por el método de Quick descrito en el libro de Biggs (112).
- El Tiempo de tromboplastina parcial activada con Kaolín se determinó por el método descrito por Proctor y Rappaport. (113,114).

- La glucosa se determinó por el método enzimático colorimérico (GOD-PAP) utilizando un un juego de reactivos de la firma Boehringer-Mannheim (115).
- Las técnicas radioisotópicas para las mediciones de la absorción de glucosa, sacarosa y fructosa en ratas.
- La fosfatasa alcalina (116), la creatinina (117) y la transaminasa glutámico pirúvica (118), se llevaron a cabo por métodos enzimáticos colorimérico utilizando un juego de reactivos comerciales de la firma cubana HELFA diagnostic.

Control de Calidad

Para el control de la calidad de las mediciones en suero de lípidos y glucosa se utilizaron patrones Preciset y controles Precinor-D de la misma firma, Boehringer-Mannheim.

2.7. Procedimiento experimental. Evaluación farmacológica de las propiedades antihiper glucemiantes del Fe⁺²-Clinoptilolita (FZ).

2.7.1. Efecto de diferentes dosis del Fe⁺²-Clinoptilolita (FZ) en ratas Wistar.

Se utilizaron 30 ratas Wistar, machos con un peso corporal entre 150-200 gramos. Se asignaron seis animales de forma aleatoria a cada uno de los cinco grupos conformados; un grupo control y cuatro bajo tratamiento.

A todos los animales, incluidos los del grupo control, se les suministró una carga de sacarosa de 2,5 g/kg de peso corporal. La administración de FZ a los cuatro grupos de tratamiento se realizó mediante dos esquemas de aplicación con un período de descanso de 10 días, en este tiempo las ratas se recuperaron adecuadamente de manera que no se produjeran interferencias con restos de la sustancia en estudio, lo que permitió emplear los mismos grupos de animales para los dos esquemas.

Procedimientos según los esquemas:

- 1- Administración del FZ mediante una sonda intragástrica, conjuntamente con la carga de sacarosa mezclados con agua.
- 2- Administración del FZ mediante una sonda intragástrica, mezclado con agua, 15 minutos antes de la carga de sacarosa.

Las dosis de FZ ensayadas fueron de 0,125 g / kg, 0,250 g / kg, 0,500 g / kg y 1 g / kg de peso corporal.

Se realizó una primera extracción de sangre en ayunas y las otras a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de haber recibido la carga de sacarosa.

2.7.2. Monitoreo de la biodisponibilidad de glucosa, fructosa y sacarosa, con isótopos marcados ^{14}C en ratas.

Estas pruebas se realizaron en el laboratorio de medicina nuclear del INACV, con el objetivo de conocer sobre el posible mecanismo de acción la Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) en condiciones fisiológicas en animales certificado por el Centro Nacional de Seguridad Nuclear (CNSN), con todas las garantías de seguridad tomadas.

Para la determinación de actividad específica en sangre, mediante el método radioisotópico se utilizó un contador de centelleo líquido para radiaciones beta de ^{14}C , por ser un método de alta especificidad y sensibilidad, que ha sido utilizado para la determinación de otros azúcares.

Las mediciones se realizaron en un equipo contador de radiaciones β en centelleo líquido LSC-2 acoplado a un contador SR-8 (NE).

Los valores de conteos obtenidos se expresaron como actividades específicas (c/g/ min) para cada tratamiento.

2.7.2.1. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre la absorción de glucosa marcada con ^{14}C en ratas Wistar.

Se utilizaron 15 ratas machos, con un peso promedio de 200 gramos, de ellas seis se designaron como controles y nueve recibieron tratamiento con FZ (0,5 g de FZ / kg de peso corporal de la rata). A todas se les suministró glucosa a razón de 1 g/kg de peso, en forma de una solución al 4% preparada a partir de glucosa pura, a la que se añadió glucosa marcada con ^{14}C con una actividad de 144Bq / g de peso. Estas soluciones fueron administradas por vía oral a través de una cánula que llegaba al estómago.

Se realizaron extracciones de sangre de la vena retroorbital mediante un capilar heparinizado, a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de las soluciones. La sangre extraída se mezcló con una gota de heparina en un tubo Eppendorf,

para evitar la coagulación. Se tomaron 0,2 ml de plasma y se llevaron a un vial de centelleo líquido, para determinar la actividad específica de glucosa marcada. Se realizaron curvas con los valores de los conteos de glucosa ^{14}C en sangre en cada uno de los tiempos en que se realizaron las extracciones de sangre. Los datos se expresaron en conteos radioactivos por minuto que son expresados como actividad específica en conteos por minuto por gramo de plasma.

2.7.2.2. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre la absorción intestinal de fructosa marcada con ^{14}C en ratas.

Se emplearon 10 ratas Wistar de entre 190 ± 10 g de peso, cinco fueron asignados al grupo control y cinco al de tratamiento con Fe^{2+} -Clinoptilolita. Al grupo control se le administraron 5 ml de una solución de fructosa marcada con ^{14}C al 4%, lo que equivale a 1g de fructosa por kg de peso corporal de la rata y a una actividad de 2726 ± 9 Bq/g de la solución de fructosa marcada.

A los animales bajo tratamiento se les administró 0,1 g de FZ por kg de peso corporal de la rata, suspendida en la solución de fructosa marcada con ^{14}C .

Las extracciones de sangre se realizaron de la vena retroorbital del ojo con capilares heparinizados a los tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de las soluciones de fructosa marcada con ^{14}C y las soluciones de fructosa marcada con ^{14}C más FZ. La sangre extraída se mezcló en un tubo Eppendorf con una gota de heparina para evitar la coagulación. Del plasma obtenido se tomaron volúmenes de 0,2 ml, con una micropipeta, y se llevaron a viales de centelleo líquido que contenían 5 ml de cóctel de centelleo.

Los valores de actividad específica en plasma de fructosa marcada obtenidos en este ensayo, se compararon con los que se obtuvo como resultado de un estudio similar realizado anteriormente con glucosa marcada.

2.7.2.3. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre la absorción intestinal de glucosa proveniente de una fuente de sacarosa marcada con ^{14}C .

Se utilizaron 10 ratas Wistar machos, con un peso promedio de 180 g, que se dividieron en dos grupos de estudio. El grupo control recibió 5 ml de una solución al 10% de

sacarosa a razón de 2,5 g de sacarosa / kg de peso corporal de la rata, esta solución contenía sacarosa marcada con una actividad de (2851±150) Bq/g de peso de la solución. El grupo de tratamiento recibió, además de la solución anterior; una dosis de FZ de 0,5 g / kg de peso de la rata. Ambas soluciones se administraron por vía oral al mismo tiempo, a través de una cánula que llegaba al estómago. Se realizaron extracciones de sangre de la vena retroorbital con un capilar heparinizado a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de los preparados. La sangre extraída se mezcló en un tubo Eppendorf con una gota de heparina para evitar la coagulación. De la sangre se obtuvo plasma, del cual se depositaron 0,2 ml en un vial, para realizar un conteo radioactivo en un equipo contador de centelleo líquido. Con estos valores se construyeron curvas que mostraron la diferencia entre los valores de absorción del grupo que recibió Fe²⁺-Clinoptilolita y del que solo se le suministró la sacarosa marcada.

Los datos fueron expresados en conteos por minuto y se calculó actividad específica en conteos por minuto por gramo de plasma.

2.7.3. Efecto del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) sobre el control glucémico en ratas hiperglucémicas.

Se utilizaron 40 ratas machos Wistar de 60 días de nacidas, con un peso corporal entre 190±10g, que permanecieron en jaulas individuales. Las mismas recibían diariamente 20g de pienso para ratas y tenían acceso al agua a voluntad. Se les indujo la diabetes por la administración de una dosis única intravenosa de STZ de 70mg / kg de peso corporal de la rata, disuelta en 0,1 ml de buffer citrato estéril, pH =4.

Los niveles de glucemia fueron medidos tres días después de la inyección de STZ con un Glucómetro. Los animales con valores de glucemia por encima de 15 mmol/L, se consideró que se habían convertido en “diabéticos”, según lo descrito por Mordes JP y Rossini AA. (101,102). Los animales hiperglucemicos se repartieron aleatoriamente en dos grupos homogéneos de 15 animales cada uno, según peso y glucemia.

Experiencias que se realizaron:

1- Caracterización de las propiedades antihiperglucemiantes del FZ después de la administración única de Streptozotocina:

Se realizó una (hiperglucemia provocada por vía oral). Luego de mantener a los animales en ayuno durante 12 horas, se les administró por vía oral una sobrecarga de 1g de glucosa por kg de peso corporal de la rata, (a través de sonda intragástrica).

La dosis de FZ se seleccionó teniendo en cuenta que la dosis efectiva media (dosis óptima) que se encontró para ratas Wistar en investigaciones anteriores, fue de 100 mg / kg de peso. Un minuto después de la administración de la carga de glucosa, se administró al grupo bajo tratamiento la dosis de FZ disuelto en un volumen de agua de 5 ml, mientras que al grupo control se le administró agua sola. Se determinaron las concentraciones de glucemia en el tiempo 0 y después del tratamiento a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos con un Glucómetro. La muestra de sangre (0,1 ml) se obtuvo por un pequeño corte en la punta de la cola cada vez.

El efecto antihiperglucemiante puede ser observado a través de la curva de glucemia y mediante el cálculo del área bajo la curva.

Los mismos animales fueron utilizados a la semana siguiente en un estudio de igual diseño, pero en el cual se empleó una sobrecarga de glucosa de 5g/kg de peso corporal para provocar la hiperglucemia. Se mantuvo la dosis de 0,1g de FZ / kg de peso corporal de la rata.

2.7.4. Efecto de la administración de dosis únicas de Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) en perros Beagles.

Hasta este momento habíamos trabajado con mamíferos pequeños como la rata, tal vez un poco más alejados de la especie humana que será el destinatario final si este producto natural con fines terapéuticos llega a probar su efectividad e inocuidad. En este trabajo se utilizaron perros Beagles que presentan un acercamiento mayor en la escala zoológica y posiblemente metabólica con el hombre. Teniendo en cuenta el mayor tamaño de estos animales la dosis utilizada en este estudio fue superior a la dosis efectiva máxima encontrada en ratas (1g/kg de peso de los perros).

Se utilizaron siete perros Beagles machos, con peso entre 8 y 10 kg. Cada uno de estos animales se utilizó como su propio control.

En la primera semana, formando parte del grupo control cada animal recibió en la mañana, después de un ayuno de 12 horas 45g de pienso en polvo para perros en

crecimiento, mezclado con glucosa (1g/kg de peso). Mientras que a la semana siguiente dentro del grupo de tratamiento, el mismo animal recibió las cantidades de pienso y glucosa antes descritas pero conjuntamente con Fe^{2+} -Clinoptilolita en una dosis de 1g/kg de peso.

Las extracciones de sangre para realizar las mediciones de glucosa en sangre se efectuaron antes de que el animal ingiriera el pienso enriquecido en glucosa, con o sin FZ, y a los 10, 20, 35, 50, 70, 90, 110, 130 150 y 180 minutos después de la ingestión.

Se calcularon las áreas bajo la curva (ABC), tiempo de máxima concentración de glucosa en sangre (T_{max}) y la concentración máxima de glucosa en sangre (C_{max}).

FORMULA PARA CALCULAR EL AREA BAJO LA CURVA (ABC)

Superficie (ABC) = $(a+b/2) \cdot T + (b+c/2) \cdot T + (c+d/2) \cdot T + \dots$

a,b,c = Concentraciones en t_1, t_2 , etc.

T = Tiempo entre dets a, b, c... ($t_1, t_2 \dots$).

2.7.5. Comparación del efecto antihyperglucemiante del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) con la Acarbosa, en perros Beagles.

El estudio y evaluación farmacológica de la capacidad digestiva de glucosa en el animal y el efecto que puede tener un medicamento sobre esta, se efectúa mediante una prueba de sobrecarga *in vivo*. Para ello se administró a cada animal, en ayunas, cantidades conocidas de carbohidratos, midiéndose a continuación la glucemia a intervalos de tiempo regulares, hasta su vuelta a la normalidad. Se obtiene así un área debajo de la curva, delimitada por la curva de las concentraciones de glucemia y los valores del tiempo en el eje de las abscisas.

Se utilizaron 20 perros Beagles machos (entre 9 y 11kg de peso). Las muestras de sangre recogidas en tubos secos de cristal se centrifugaron a 3 500 r.p.m. después de haberse retraído el coágulo para obtener el suero.

Teniendo en cuenta que la dosis efectiva máxima para el Fe^{2+} -Clinoptilolita encontrada en ratas Wistar fue de 0,5 g por kg de peso del animal y que los perros destinados al estudio pesaban entre 9 y 11kg (como promedio 10 kg), se decidió administrarles una dosis de FZ de 5 g. En lo que respecta a la Acarbosa, la dosis media por día para un humano de 70 kg es de 300 mg, lo que equivale en el perro de 10 kg a 42 mg por día. Se decidió sin

embargo, aumentar esta dosis a 100 mg para aumentar el efecto del medicamento, aunque no teníamos referencias de la dosis óptima o máxima en perros.

Se formaron cinco grupos de perros, los mismos animales se utilizaron en más de una ocasión, en distintos tratamientos, siempre destinando una semana al descanso y la recuperación entre uno y otro estudio.

En la tabla 3 se expone la distribución de los animales por grupos y la composición de la dieta en cada caso, la cual especifica la cantidad de pienso y las dosis de los medicamentos a comparar. Tanto los tratados con Acarbosa como con Fe^{2+} -Clinoptilolita ingirieron estos mezclados con 50 gramos del pienso en polvo, y posteriormente se les proporcionaba el resto de la ración de alimentos.

Tabla 3. Características de la dieta suplementada por grupos de perros.

Grupos	N	Tratamientos
I	18	Pienso (400 g)
II	16	Pienso (400 g), sacarosa (50 g)
III	10	Pienso (400 g), sacarosa (50 g), Acarbosa (100 mg)
IV	13	Pienso (400 g), sacarosa (50 g), Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) (5g)
V	9	Pienso (400 g), sacarosa (50 g), Acarbosa (100 mg) FZ(5g)

Las extracciones de sangre se realizaron de la vena cubital de la pata anterior derecha (2ml), las determinaciones de glucemia fueron al tiempo 0 y a los 30, 60, 90 y 120 minutos, después de la ingestión conjunta del alimento y los medicamentos.

2.7.6. Evaluación de otros efectos del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre las concentraciones de lípidos y la coagulación en animales.

2.7.6.1. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos en conejos.

Se utilizaron 28 conejos machos, Chinchillas, con un peso corporal entre 1,8 y 2 kg. Todos recibieron una dieta de pienso normal para conejos durante el período de estudio. Los animales permanecieron en jaulas individuales identificadas por grupos mediante tarjetas,

donde se registró el grupo de tratamiento, fecha de comienzo y terminación del tratamiento, fecha de extracciones, fecha de sacrificio, peso y cualquier otro dato de interés que apareciera durante la investigación. Los animales tenían libre acceso al agua y a la comida durante todo el período que duró el estudio, así mismo existió humedad, temperatura y luz natural.

Se conformaron aleatoriamente cuatro grupos experimentales constituidos por siete animales cada uno. Un grupo control al que no se le administró el preparado de FZ y tres grupos que recibieron diferentes dosis de FZ incluido en el pienso (100g por día) según exponemos a continuación:

Grupo I. Control. Lactosa talco aproximadamente 2g / kg de peso al día (4% en el pienso).

Grupo II. Tratamiento con FZ aproximadamente 0,5 g / kg de peso al día. (1% en el pienso).

Grupo III. Tratamiento con FZ aproximadamente 1 g / kg de peso al día. (2% en el pienso).

Grupo IV. Tratamiento con FZ aproximadamente 2 g / kg de peso al día. (4% en el pienso).

El FZ se administró incluido en 100 g de pienso, siete veces a la semana durante un período de 42 días. A cada animal se le realizó una extracción de sangre de la vena central de la oreja, antes de comenzar el estudio y 42 días después.

Se realizaron mediciones de glucemia, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol total, fosfatasa alcalina, creatinina y transaminasa glutámico pirúvica.

2.7.6.2. Efecto del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) sobre algunos parámetros de la coagulación (tiempo de protrombina y del tiempo de tromboplastina parcial activada con caolín) en perros Beagles.

Se estudiaron 10 perros Beagles que fueron asignados aleatoriamente a uno de 2 grupos de cinco perros cada uno, un grupo control y otro tratado con FZ, con el fin de detectar un posible efecto de este producto sobre la coagulación.

La dosis de FZ empleada en este estudio fue superior a la dosis máxima encontrada en ratas, se debe al antecedente de un estudio en que CZ (un derivado zeolítico intercambiado con calcio) produjo alteración de las variables que reflejan la coagulación, cuando se utilizó dosis extremadamente altas.

Todos los animales recibieron diariamente durante 18 días, 400 gramos de pienso para perros; el grupo tratado recibió el FZ al 2% adicionado en el pienso.

Las extracciones de sangre se realizaron de la vena cubital de una de las patas delanteras, con jeringuillas plásticas, antes de comenzar la administración del FZ y al final de los 18 días que duró el estudio; las muestras de sangre se recogieron en tubos plásticos que contenían citrato de sodio al 3.8 % para el estudio de la coagulación y en tubos secos de cristal para la determinación de la glucemia por el método de la glucosa-oxidasa. Se obtuvo plasma pobre en plaquetas por la centrifugación de la sangre anticoagulada para las determinaciones del tiempo de protrombina (TP) y del tiempo de tromboplastina parcial activada con caolín (TPTK). Mientras que las muestras de sangre recogidas en tubos secos de cristal, se centrifugaron a 3,500 rpm después de la retracción del coágulo.

2.8. Estudios toxicológicos realizados al Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ).

El FZ ha manifestado efecto antihilerglucemiante en estudios *in vitro* y en animales de experimentación y se hace necesaria su evaluación toxicología, comenzando por la toxicología aguda y a medida que mostrara su inocuidad continuo otras etapas de estudios toxicológicos.

2.8.1. Toxicidad aguda del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ).

Este estudio fue realizado en el departamento de evaluación de productos naturales del CENSA.

El producto fue evaluado en estudios de toxicidad oral aguda por el biomodelo alternativo de la LD-50 (118), en Ratas Wistar (12) y en conejos de la línea Semigigante Español (6), de ambos sexos.

A todos los animales bajo tratamiento se les administró por vía oral mediante sonda esofágica, previo ayuno de 12 horas una dosis única de FZ considerada límite de 5g/kg de masa corporal. Se utilizó como vehículo goma tragacanto 1%, adecuando el volumen a cada especie (5 ml en ratas y 20 ml en conejos). Los grupos controles recibieron en igual volumen solo goma tragacanto al 1%.

El alimento fue retirado 12 horas antes del tratamiento, en tanto que el agua fue mantenida durante toda la evaluación.

Posterior a la aplicación del producto se mantuvo observación diaria individual durante 15 días.

Al final de la evaluación se procedió al sacrificio para el examen anatomopatológico, se realizó descripción macroscópica y microscópica con especial énfasis del tracto digestivo atendiendo a lo establecido en las normas de la Comunidad Económica Europea (119).

2.8.2. Evaluación mutagénica del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ).

Realizados en el Centro de Toxicología y Experimentación Animal, CETEX Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB.

Departamento de Genotoxicidad.

Las pruebas se ejecutaron siguiendo las líneas directrices de la OCDE, 1993 FDA y de la Comunidad Económica Europea de 1993, para los ensayos de genotoxicidad (sección 4. Health Effects) y cumplimentando el código de las buenas prácticas de laboratorio para la Toxicología Experimental del CENTEX, así como las resoluciones y regulaciones del MINSAP, que se exigen por el Centro Estatal para el Control de Medicamentos CECMED, autoridad reguladora cubana.

Los protocolos de trabajo se realizaron teniendo en cuenta las directrices de la OCDE. (Organisation for Economic Co-Operation and Development) y la FDA (Food and Drug Administration), que han sido validados y aceptados para la evaluación genotóxica.

Se realizaron los siguientes estudios genotoxicos:

- 1- Ensayo citogenético de la médula ósea en ratas CENP: SPRD
- 2- Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones. CENP: NMRI
- 3- Ensayo de anormalidades de la cabeza del espermatozoide en ratones CENP: NMRI.

Condiciones ambientales.

El ensayo se realizó en una Sala Protegida de alta seguridad, hermética, con aire tratado para temperatura, humedad, presión positiva y caudal y es ultrafiltrado mediante filtros HEPA con un 99.98% de eficiencia.

Temperatura: 24 ± 3 °C; Humedad relativa: 60 ± 10 %; Cambios de aire: 15 cambios/hora (sin recirculación); Fotoperíodo: Ciclo de 12 horas luz en 24 horas.

Distribución e Identificación.

Durante el período de readaptación, los animales se distribuyen al azar por grupos, sexos y estantes hasta conformar los grupos experimentales.

La identificación de los animales se realizó por medio de tatuaje en ambas orejas. También se identificaron por tarjetas que fueron colocadas en las jaulas. Las tarjetas portaron el número único de identificación del animal, compuesto de dos dígitos.

Observaciones de signos de toxicidad:

Diariamente se registraron la duración e intensidad de los mismos, se observó: caída y aspecto del pelo, estado de los ojos y las mucosas, estado general, patrones de comportamiento, letargo, sueño, coma, actividad motora, presencia de convulsiones o muerte, diarreas y salvación.

Peso corporal: Se pesaban los animales individualmente antes de comenzar el tratamiento y semanalmente una vez comenzado el mismo asentándose en un modelo.

Consumo de agua y pienso: Se realizó individualmente semanalmente durante el tiempo del ensayo. Se calculó la media por grupos asentándose en el modelo.

2.8.2.1. Evaluación mutagénica del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ). Ensayo citogenético de la médula ósea en ratas CENP: SPRD.

Se utilizaron 30 ratas de ambos sexos (10 animales, cinco machos y cinco hembras en cada grupo). Cenp: SPRD (Sprague Dawley). Se formaron tres grupos de estudio:

Grupo 1. Control negativo: Carboximetilcelulosa.

Grupo 2. Control positivo: 40 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida.

Grupo 3. . Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) 2g/kg de peso corporal.

Las ratas recibieron el FZ y la carboximetilcelulosa por vía oral, mientras que la ciclofosfamida se administró por vía intraperitoneal, todos los animales fueron sacrificados a las 24 horas después del tratamiento, mediante narcosis con éter y dislocación cervical.

Dos horas antes del sacrificio a los animales se les administró por vía intraperitoneal Colchicina en dosis de 4 mg/kg de peso corporal.

Se colectó la médula ósea del fémur de tres animales y se procedió a su preparación para el análisis microscópico. En portaobjetos húmedos y fríos, se dejaron caer dos o tres gotas de suspensión celular y las láminas se secaron al aire y se tiñeron con una solución

de Giemsa. Se analizaron 50 metafases por animal para cuantificar las aberraciones cromosómicas.

2.8.2.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones CENP: NMRI.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el posible efecto mutagénico del FZ, mediante el estudio de los micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de la médula ósea del ratón CENP: NMRI y el efecto citotóxico en la relación eritrocitos policromáticos-cormocromáticos.

La prueba se ejecutó siguiendo las mismas directrices del ensayo de aberraciones cromosómicas.

El ratón en general es una de las especies de roedores más utilizadas en investigaciones de Toxicología Genética y la línea NMRI. presenta un bajo nivel espontaneo de micronúcleos, así como una alta sensibilidad a diferentes mutágenos por lo que constituye un biomodelo adecuado para realizar este estudio.

Se utilizaron 30 ratones de ambos sexos (10 animales, cinco machos y cinco hembras en cada grupo). CENP: NMRI, suministrados por la división de roedores Gnotobióticos del CENPALAB.

Se conformaron los mismos grupos de estudio que para el ensayo anterior.

Grupo 1. Control negativo: Carboximetilcelulosa.

Grupo 2. Control positivo: 40 mg de ciclofosfamida /Kg de peso corporal.

Grupo 3. Fe⁺²-Clinoptilolita (FZ) 2g/Kg de peso corporal.

Al grupo 1 (control negativo) se le administró carboximetilcelulosa por vía oral durante 2 días y al grupo 2 (control positivo) se le administró ciclofosfamida por vía intraperitoneal, (una sola dosis), el grupo 3 recibió FZ por vía oral, durante dos días. A las 24 horas de concluido el tratamiento, se sacrificaron los animales y se colectó la médula para su procesamiento y análisis. Se analizaron 500 eritrocitos policromáticos por láminas (1000/animal) para determinar el porcentaje de micronúcleos. Para el índice de citotoxicidad se contaron 500 células por animal (107, 120).

2.8.2.3. Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide en ratones

CENP: NMRI.

El objeto del presente estudio fue evaluar el posible efecto genotóxico y citotóxico del FZ sobre los espermatozoides del ratón.

Este estudio ha sido validado y aceptado para la evaluación genotóxica (120,121).

Se conformaron tres grupos experimentales de ratones Cenp: NMRI, conformado por cinco machos cada uno, entre 8 y 12 semanas de edad, con rango de peso corporal entre 27 y 30 gramos.

Grupo 1. Control negativo: Carboximetilcelulosa.

Grupo 2. Control positivo: 20 mg de acrilamida /Kg de peso corporal.

Grupo 3. Fe⁺²-Clinoptilolita (FZ) 2g/kg de peso corporal.

La acrilamida se administró por vía intraperitoneal a la dosis establecida. El FZ y la carboximetilcelulosa se administraron por vía oral, por cinco días.

A los 35 días de iniciado el tratamiento los animales se sacrificaron, procediéndose a la extracción de la cola del epidídimo la cual fue procesada para la obtención de la suspensión espermática. Se analizaron 500 espermatozoides por lámina (1000 por animal) para detectar el porcentaje de anomalías, según la clasificación de Wyrobek y Bruce (120).

2.9. Análisis estadísticos y procesamiento de datos.

Todas las variables determinadas fueron sometidas a pruebas estadísticas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de homogeneidad de varianza de Cochran C, Hartley y Bartlett. En los casos en que se cumplieron ambas condiciones se llevaron a cabo comparaciones entre medias mediante Análisis de Varianzas (ANOVA) y para establecer nivel de significación de cada uno de los tratamientos se procedió a la realización de la prueba *post hoc* de rangos múltiples de Student Newman-Keuls (SNK). Las variables que no cumplieron con las condiciones de homogeneidad y normalidad, fueron analizadas mediante la prueba U de Mann-Whitney. En todos los casos se realizaron los análisis estadísticos para el 95% y 99% de confianza, mediante el programa SPSS para Windows, versión 11.5.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.

Introducción al capítulo.

En el presente capítulo se exponen los resultados de los estudios realizados, en los que se ha observado el efecto antihiper glucemiante del Fe²⁺-Clinoptilolita en varias especies de animales de experimentación y su dependencia de la dosis empleada, así como los resultados de la comparación del efecto del FZ con el que produce la Acarbosa, un medicamento antihiper glucemiante que se comercializa internacionalmente.

Tres investigaciones muestran la cinética de absorción de glucosa, fructosa y sacarosa marcadas con ¹⁴C, bajo el efecto de la administración de FZ, observándose una diferencia en la absorción de estas sustancias en presencia del producto. Se describe el posible mecanismo de acción del FZ como antihiper glucemiante.

Se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de este producto sobre algunos lípidos del plasma en conejos y sobre la coagulación en perros.

Por último se exponen los resultados de las pruebas de toxicología aguda y mutagénesis.

3.1. Evaluación de las propiedades antihiper glucemiantes del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) en animales de experimentación.

A partir de los resultados obtenidos en la captación o adsorción de glucosa por el FZ en los estudios *in vitro* (10,11), se consideró que la utilización de esta sustancia en animales de experimentación, podría ser capaz de disminuir los niveles de glucosa en sangre, como ocurre con el efecto de los medicamentos antihiper glucemiantes inhibidores de las enzimas alfa glucosidasas (la Acarbosa, el Fibraguar y el Miglitol) (68,122).

3.1.1. Estudio de diferentes dosis de Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) en ratas Wistar.

En la tabla 4 se muestran los resultados del cálculo de las áreas bajo la curva de concentraciones de glucosa en sangre, para cada uno de los grupos de ratas que fueron analizados durante dos horas con determinaciones de glucosa cada 30 minutos, teniendo en cuenta que se emplearon dos esquemas de aplicación del FZ; uno 15 minutos antes de la administración de la sacarosa y en el otro conjuntamente con esta, al mismo tiempo de administrarse las diferentes dosis del producto (FZ).

Tabla 4. Valores de las áreas bajo la curva (ABC) de la cinética de biodisponibilidad de glucosa en ratas Wistar, tratadas con diferentes dosis orales de FZ, Simultáneamente y 15 minutos antes de la sobrecarga de sacarosa.

Tratamientos	15 minutos antes		Simultáneamente	
	Área(ABC) (mmol/l/min)	% disminución	Área(ABC) (mmol/l/min)	% disminución
Control	705 ± 47 ^a	---	763 ± 34 ^a	---
0,125 g/kg	606 ± 41 ^b	14,1	659 ± 54 ^b	13,7
0,250 g/kg	566 ± 84 ^b	19,7	617 ± 47 ^b	19,13
0,500 g/kg	557 ± 54 ^b	21	582 ± 43 ^c	23
1 g/kg	582 ± 39 ^b	17,5	625 ± 36 ^b	18,1

Nota: Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)

Se puede observar cómo los grupos que recibieron las diferentes dosis del producto (FZ), muestran áreas (Biodisponibilidad de glucosa en sangre) significativamente menores, que las obtenidas para el grupo control, destacándose que los mejores resultados se obtienen para la dosis de 0,500 g/kg de peso. Todos los datos siguieron una distribución normal y con homogeneidad de varianza.

Aunque con los dos esquemas de administración se obtienen resultados similares, se observa que en el esquema de tratamiento donde los animales recibieron el FZ junto a la carga de sacarosa se obtienen mejores porcentajes de disminución, mientras que solo en este esquema de tratamiento se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar la dosis de 0,5 contra la de 0,125 g/kg y 0,250 g/kg de peso. De estos resultados pensamos que por motivos de facilidad a la hora de la aplicación futura de producto sería conveniente administrar el medicamento simultáneamente o antes de las comidas.

Al analizar los resultados expuestos en la tabla 4, observamos que en el experimento donde las ratas recibieron el FZ junto a la sacarosa (al mismo tiempo) figura 4, solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el momento inicial y a los 60

minutos de haber sido administrado el producto en dosis de 0,5 y 1g de FZ por kg de peso, estos resultados se presentan en la figura 5.

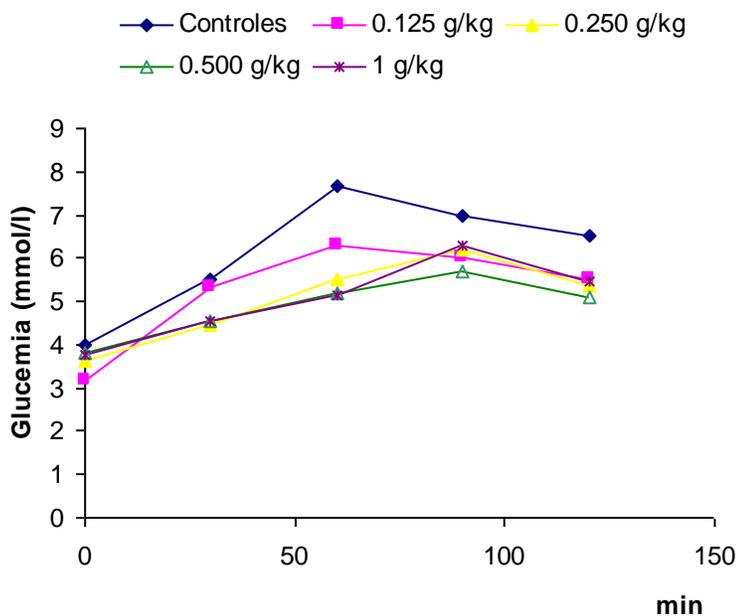


Figura 4. Cinética de biodisponibilidad de glucosa en ratas sometidas a distintas concentraciones de FZ simultáneamente con sacarosa.

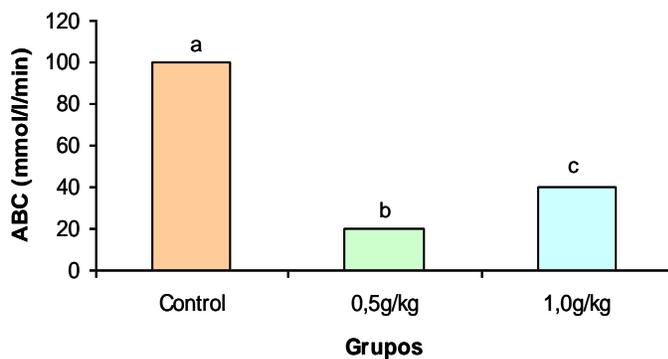


Figura 5. Biodisponibilidad de glucosa (ABC) en ratas, en la primera hora de estudio cuando se suministran FZ (0,5 y 1 g/kg) simultáneamente con sacarosa. [Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)]

En esta figura también se aprecian las diferencias entre las áreas, así como los porcentajes de disminución que se produjeron en los valores de glucosa en sangre por efecto del FZ, en los animales tratados con las dosis de 0,5 y 1g/kg de peso con respecto a los obtenidos en el grupo control. En el análisis de las áreas bajo las curvas obtenidas mediante el ensayo del efecto antihiper glucemiante de las diferentes dosis de FZ para obtener la dosis efectiva 50 (DE₅₀), encontramos que esta se logra con una dosis de 0,1 g/kg de peso y la dosis de Efecto Máximo fue 0,5 g/kg de peso, en las ratas de estudio, según el método de Litchfield y Wilcoxon (Método Probit) descrito en materiales y método. La LD 50 es un parámetro de referencia que contribuye a conocer el índice de seguridad del producto. Por posibles efectos indeseables y de seguridad, la dosis efectiva media es la que debemos emplear.

En el organismo animal de las ratas, bajo condiciones fisiológicas normales, la ingesta y absorción de glucosa a la sangre provoca un incremento en la secreción y las concentraciones de insulina en la sangre, lo que implica un incremento de la utilización de carbohidratos por el músculo y el tejido adiposo, además del cese de la producción hepática de glucosa y la inhibición de la glucólisis.

La concentración de glucosa plasmática en el organismo animal sano está sometida a un riguroso control. Habitualmente oscila entre 4,4 y 5 mmol/L en sangre por la mañana en ayuno. Esta concentración se eleva de 6,6 hasta 7,7 mmol/L en la primera hora después de las comidas, si bien los sistemas de retroalimentación devuelven la glucemia de inmediato a sus valores habituales, casi siempre a las 2 horas desde la última absorción de carbohidratos. Posterior a la ingesta de alimentos, el aumento de la concentración de glucosa plasmática al sobrepasar un nivel crítico, induce un alza en la liberación de insulina, lo que hace que hasta dos tercios de la glucosa absorbida sea almacenada en el hígado en forma de glucógeno. La insulina y el glucagón de origen pancreático, operan como sistemas retroactivos esenciales para mantener la glucemia dentro de límites normales. Cuando la concentración de glucosa en sangre aumenta, se secreta insulina; a su vez, la insulina reduce la glucemia hasta valores normales (123). Por tanto la curva de las concentraciones de glucemia en sangre en humanos, cuando el metabolismo no se encuentra alterado, parte de valores entre 4,5 y 5 mmol/L para elevarse en la primera

media hora después de la ingestión de glúcidos a niveles de 6,6 a 7,7 mmol/L, mientras en la segunda media hora desciende hasta llegar a valores normales en la hora siguiente. Las curvas glucémicas en los grupos de ratas que participaron en este estudio de dosis-efecto tuvieron un comportamiento normal para la especie.

FZ, mostró efecto sobre las concentraciones normales de glucosa en sangre de las ratas después de la ingestión de carbohidratos en forma de glucosa, se observó la modificación de estas curvas que representan una prolongación de la absorción de la glucosa (Tabla 4 y figuras 4 y 5), disminuyendo las áreas bajo la curva de los animales que lo ingerían, con una dosis efectiva media aceptable para un medicamento de su tipo, comparable con los que existen en el mercado; la Acarbosa y el Fibraguar (123-125).

3.1.2. Absorción de sacáridos con isótopos marcados en ratas.

3.1.2.1. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre la biodisponibilidad de glucosa marcada con ^{14}C en ratas Wistar.

En la figura 6 pueden observarse las concentraciones medias de glucosa en el suero de las ratas de ambos grupos (control y tratadas con FZ), medidos indirectamente a través de los conteos de radiaciones β y del cálculo de actividad específica de ^{14}C unido a la molécula de glucosa. Las concentraciones obtenidas para el grupo que recibió glucosa, junto al suplemento de FZ, son inferiores. También el área bajo la curva de este grupo fue inferior (Tabla 5), lo que evidencia, el efecto sobre la glucosa en sangre de este producto *in vivo*. Ambos grupos (control y tratamiento) presentaron el pico de máxima absorción de glucosa a los 30 minutos.

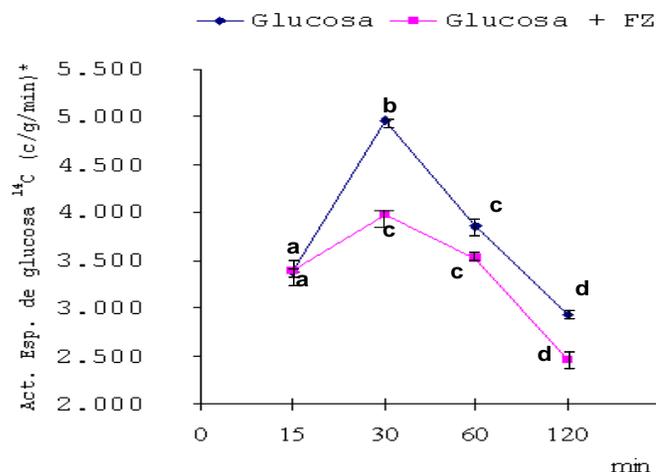


Figura 6. Actividad específica de glucosa en sangre de ratas, medida como ^{14}C en los grupos: control y tratado con FZ. **Nota:** Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de las curvas de actividad de glucosa marcada con ^{14}C en sangre en los diferentes grupos de ratas (control y tratado con FZ)

	Control	Glucosa ^{14}C FZ
Área debajo de la curva (entre 15 y 60 min) (c/l/min)	194783	167618*
Tiempo de concentración máxima (min)	30	30
Concentración máxima act. específica (c/g/m)	4964	3972

* Grado de significación según el ANOVA para $p < 0,05$

Estos resultados sugieren la posible propiedad de FZ para captar glucosa en el sistema digestivo, y por tanto disminuir la absorción intestinal del monosacárido, mecanismo este que le confiere al producto una notable utilidad para controlar las concentraciones de glucosa en sangre, resultado acorde con los estudios *in vitro* llevados a cabo por

Concepción Rosabal donde observó una captación o adsorción de glucosa por el FZ (10, 11, 44, 45).

3.1.2.2. Efecto del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) sobre las concentraciones de fructosa marcada con ¹⁴C en ratas.

En la figura 7 se presentan los valores de actividad específica de fructosa marcada con ¹⁴C en (conteos /g.min) a los tiempos en los cuales se realizaron las determinaciones en sangre, después de administrada a las ratas la fructosa marcada por vía oral.

La fructosa en sangre alcanza su máximo valor alrededor de una hora después de suministrada la carga de fructosa tanto sola como con el FZ.

Como los datos no cumplieron con la normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó el método no paramétrico de Mann-Whitney para la estimación de las diferencias entre el grupo control y el de tratamiento con FZ, observándose que existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con tratamiento.

Puede apreciarse que los picos de máxima absorción para los azúcares estudiados se observan a diferentes tiempos, la absorción de la fructosa es más lenta que la de glucosa cuyo máximo de absorción correspondió a los 30 minutos, según el experimento anterior, mientras que la fructosa fue a los 60 minutos. Estos resultados sugieren una vez más que el FZ es capaz de disminuir la absorción de glucosa a la sangre inmediatamente después de la ingestión de glucosa, sin embargo, la fructosa se comporta diferente.

Esto se debe a que la velocidad de absorción de la fructosa desde la luz intestinal a la sangre es menor que la glucosa. En esta figura se aprecia que la absorción de fructosa se afecta poco cuando se ingiere junto con el FZ. Las investigaciones llevadas a cabo por Concepción-Rosabal, *in vitro*, demuestran que existe una captación preferencial de FZ por la glucosa, resultados que concuerdan con los obtenidos *in vivo* en ratas tratadas con FZ. Donde se observó una captación preferencial o adsorción de glucosa por el FZ en el sistema digestivo (10,11, 44, 45), con un comportamiento diferente de la fructosa.

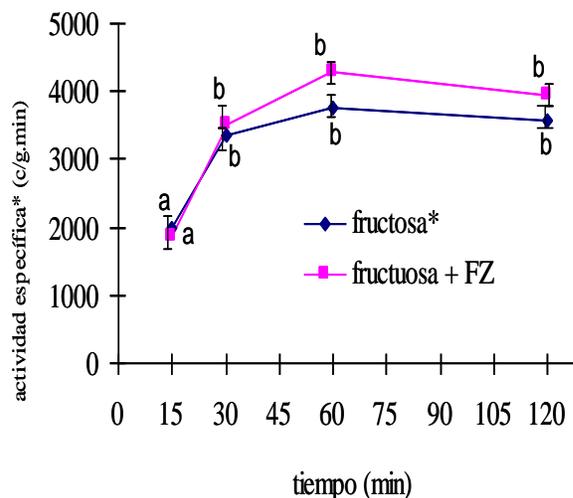


Figura 7. Actividad específica de fructosa en sangre de ratas, medida como ^{14}C en los grupos: control y tratado con FZ. [Las barras indican la desviación estándar de la media. Las letras no comunes indican diferencias significativas según el método no paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$)]

Estos resultados sugieren una baja adsorción de la fructosa por el FZ cuyas concentraciones en sangre no se ven afectadas por la ingestión de FZ como ocurre con la glucosa, este comportamiento es sugerente de la afinidad adsortiva del FZ hacia la glucosa frente a la fructosa, que pudiera estar fundamentada por las diferencias en el mecanismo de interacción entre los iones Fe^{2+} del FZ y los átomos oxígenos de los grupos carbonilo de las funciones aldehído y cetona de la molécula de glucosa y la fructosa respectivamente.

3.1.2.3. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre la biodisponibilidad intestinal de glucosa proveniente de una fuente de sacarosa marcada con ^{14}C .

En la figura 8 se observan los resultados de la determinación de la actividad específica en sangre para cada tiempo en los cuales se realizaron las extracciones. Así mismo se determinaron las áreas bajo la curva y se compararon los resultados entre los dos grupos, control y el tratado con FZ.

Los resultados presentados en la Figura 8 muestran niveles inferiores de glucosa marcada en sangre en las ratas del grupo tratado con (FZ), medidos indirectamente a través de las actividades específicas de la glucosa que pasó hacia la sangre, datos que tuvieron una distribución normal y con homogeneidad de varianza.

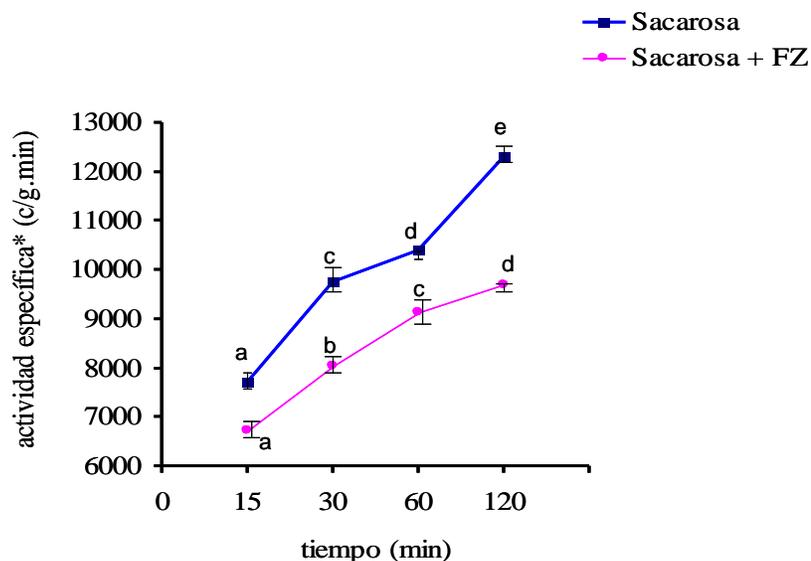


Figura 8. Actividad específica de glucosa y fructosa en sangre de ratas, medida como ^{14}C en los grupos: control y tratado con FZ. Con una sobrecarga de sacarosa. [Las barras indican la desviación estándar de la media. Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)]

Las áreas bajo las curvas mostraron diferencias ($p < 0,05$). En el grupo tratado con FZ fue de 83 % con respecto al grupo sin tratamiento, es decir, un 17% menor. De estos resultados se puede inferir que existe una menor absorción de glucosa en este grupo que recibió FZ. Se corroboró la efectividad del FZ en la disminución de la biodisponibilidad de glucosa en sangre, cuando la fuente de ingestión de glucosa es un disacárido como la sacarosa. El paso hacia la sangre de la glucosa escindida por las alfa-glucosidasas intestinales a partir de la sacarosa ingerida, fue limitado (menor cantidad), en las ratas a las que se les administró FZ.

Estos resultados sugieren que la glucosa y la fructosa liberadas por la acción enzimática de las alfa-glucosidasas intestinales sobre la sacarosa, fue absorbida hacia la sangre en menor cantidad, aunque es posible que una parte de la actividad de ^{14}C detectada se deba a la presencia de fructosa marcada, ya que el marcaje radioisotópico de la sacarosa ocurre indistintamente en los carbonos de la fructosa y la glucosa, pero como este fenómeno ocurre por igual en los dos grupos y los conocimientos de los estudios anteriores *in vitro* (10, 11, 44, 45), e *in vivo* muestran que la captación de glucosa es preferencial creemos que la diferencia estadística ($p < 0,05$), entre las dos curvas se deba

a la disminución en la absorción de glucosa y no por la parte que le corresponde a la fructosa.

Teniendo en cuenta que la actividad específica ^{14}C en plasma fue un 17 % inferiores en el grupo con tratamiento que en el grupo control, podemos pensar que el FZ disminuyó el paso de carbohidratos a la sangre, sugiriendo que su propiedad como adsorbente de glucosa en el intestino se mantiene aún cuando se ingiera esta en forma de un sacárido complejo como la sacarosa.

Sin embargo, se observó que cuando se dio por concluido el estudio, a las 2 horas de haberse administrado la carga de sacarosa, no se había alcanzado el punto o tiempo de máxima absorción, es posible que a ese tiempo no hubiera concluido la escisión y absorción de la glucosa y la fructosa liberadas por las enzimas alfa-glucosidasas.

Una cantidad significativa de fructosa resulta de la digestión de la sacarosa, la cual es convertida en glucosa en la pared intestinal antes de pasar a la circulación portal y al hígado.

3.2. Efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) sobre el control glucémico en un modelo de ratas que se le ha provocado hiperglucemia.

Los resultados obtenidos hasta este momento de la investigación sugieren el efecto antihyperglucemiante del FZ, basado en su propiedad adsorbtiva sobre la glucosa, así como que esta acción que se había encontrado inicialmente en estudios *in vitro*, podía ocurrir en el intestino de animales de experimentación sanos a los que se administraba el producto conjuntamente con carbohidratos seleccionados en concentraciones conocidas.

Se hacía necesaria la caracterización de las propiedades antihyperglucemiantes del FZ, en condiciones más cercanas a las que encontrará en el desempeño de la práctica clínica.

Teniendo en cuenta los argumentos antes expresados se llevó a cabo la realización de un estudio en animales “diabéticos”, específicamente en ratas a las que se provocó una diabetes experimental por la administración única de Streptozotocina (106), que las convirtiera en ratas hiperglucémicas “diabéticas”.

Características generales de los animales. Inicialmente el 70% de los animales se convirtieron en hiperglucémicos, lo que se comprobó por la determinación de glucemia en ayunas. Se observó que estos animales ingerían agua y alimentos en mayor cantidad.

Se evaluó el efecto del FZ (dosis de 0,1g/kg de peso) sobre los niveles de glucemia determinados en los tiempos 0, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, posteriores a la administración de una carga de glucosa de 1g/kg de peso de la rata (se empleó esta prueba de tolerancia a la glucosa por ser representativa de la medición de la glucemia postprandial). Los resultados que aparecen en la figura 9; muestran valores medios de glucemia inferiores en el grupo bajo tratamiento con FZ, especialmente a los 30 minutos que fue el punto de máxima absorción de glucosa.

Los valores iniciales de glucemia en ayunas se comportaron dentro del rango normal para estos animales, algo no esperado, pues la aplicación de Streptozotocina debió convertir los mismos en ratas hiperglucémicas en ayunas, de forma estable y por tiempo prolongado. A penas 10 días después los animales estaban normo glucémicos en la extracción inicial. Otros autores han contactado que las ratas hiperglucémicas tratadas con STZ tienden a una recuperación a largo plazo a partir del pequeño grupo de células de los islotes que quedaron intactas. De hecho las ratas en este estudio volvieron a la normalidad en un corto plazo de tiempo, que no corresponde con lo descrito en la literatura. Parece ser que la dosis aplicada o las características metabólicas propias de estas ratas las llevaron a una recuperación temprana.

De todas formas las elevaciones de glucemia provocadas en estos animales muestra un daño pancreático y los resultados de la aplicación del FZ sobre la glucemia postprandial se mostraron en el estudio de estas ratas a las cuales se le había provocado un daño pancreático.

El tratamiento con FZ disminuyó el pico glucémico que se produce como consecuencia de la ingestión de la carga de glucosa como se observa en la figura 9.

El resultado de hallar el área bajo la curva, con dosis de glucosa aplicada de 1g/kg peso de la rata, fue 12,3% menor en el grupo bajo tratamiento con respecto al grupo control.

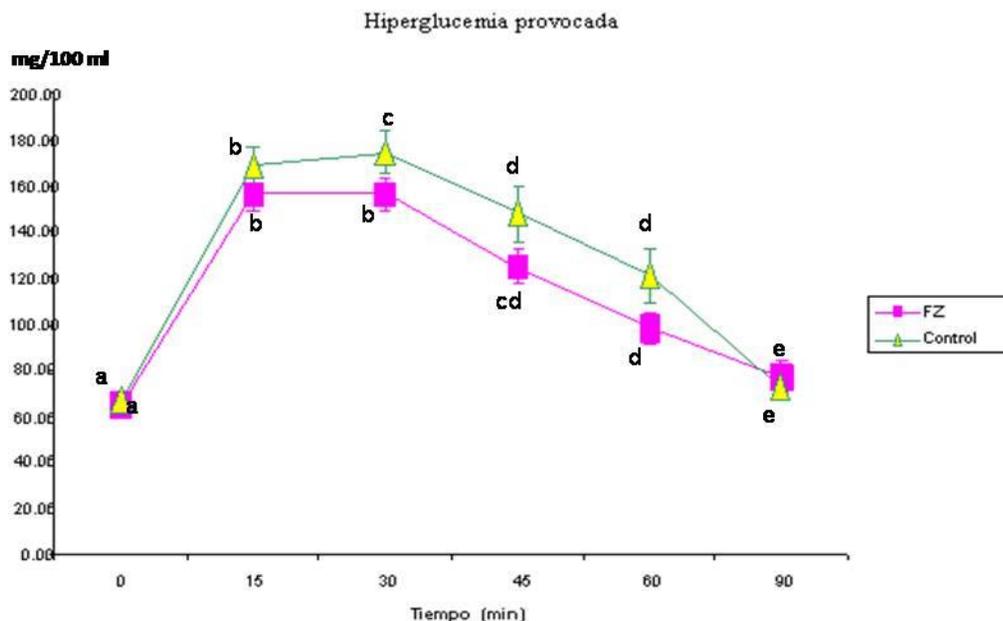


Figura 9. Evolución temporal de la glucemia en ratas con hiperglucemia inducida, tratadas con FZ 0,1g/kg y glucosa 1g/kg de peso) y un grupo control (Glucosa 1g/kg de peso). **Nota:** Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)

Se evaluó además el efecto del FZ en dosis (0,1g/kg de peso) sobre las concentraciones de glucosa determinados a tiempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minutos, posteriores a la administración, en este caso, con una carga de glucosa de 5g/kg de peso de la rata. Los resultados se muestran en la figura 10; se observa que los valores medios de glucemia en los animales del grupo bajo tratamiento son menores, especialmente a los 90 minutos que fue el punto de máxima absorción, lo cual evidencia que el FZ disminuye el pico glucémico en comparación con el grupo control en el período postprandial. En este estudio en que se administra una carga mayor de glucosa (5g/kg de peso) se obtiene un efecto más pronunciado del FZ como se observa en el cálculo del área bajo la curva, que resultó significativo con ambas dosis de glucosa administrada.

El resultado de determinar el área bajo la curva, con dosis de glucosa aplicada de 5g/kg peso de la rata, fue 35% menor en el grupo bajo tratamiento con respecto al grupo control. El efecto antihiperglucemiante se evidenció a través de la comparación de las concentraciones de glucosa determinados en un grupo control sin tratar, con respecto a

un grupo tratado con una dosis de FZ (de 0,1g/kg de peso corporal), después de la administración por vía oral de una carga de glucosa. Estas características se repitieron en el segundo estudio que se diferenciaron entre sí solo por la concentración de glucosa administrada figuras 9 y 10.

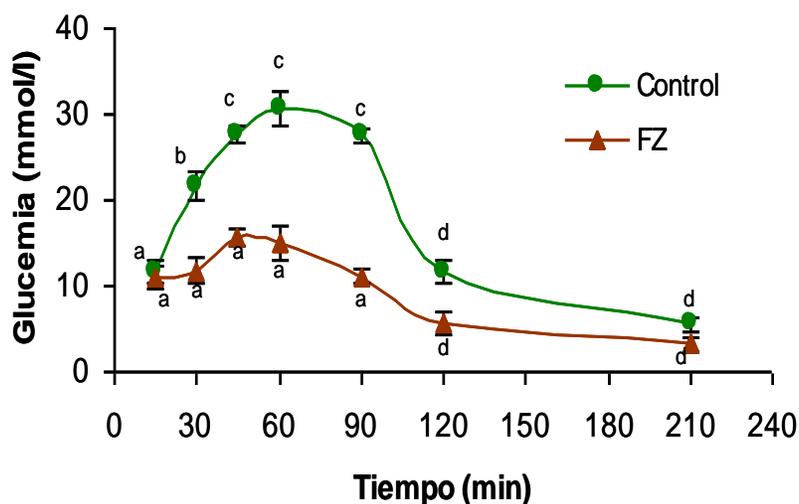


Figura 10. Evolución temporal de la glucemia en ratas con hiperglucemia inducida, tratadas con FZ 0,1g/kg y glucosa 5g/kg de peso y un grupo control (Glucosa 5g/kg de peso). [Las barras indican la desviación estándar de la media. Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)]

Tanto para la carga de glucosa de 1g/kg de peso como para la de 5g/kg, la glucemia fue menor en el grupo tratado con FZ, lo que se hizo más evidente para la carga mayor de glucosa, siendo este un resultado inesperado, ya que previamente habíamos pensado que a mayor carga de glucosa se produciría la saturación del FZ que limitaría su efecto, sin embargo, al parecer el incremento de la concentración de glucosa en el medio provoca un aumento en la propiedad de adsorción del FZ y por tanto en su eficacia, lo que hace más prometedora la efectividad del producto. FZ es capaz de soportar cargas mayores de glucosa cuando sus concentraciones en el medio son mayores.

Basándonos en los resultados satisfactorios obtenidos hasta ahora, se puede plantear que el FZ reúne cualidades tan importantes como la efectividad, la inocuidad y la economía, debido a esto, pudiera estar destinado a mejorar la calidad de vida de pacientes diabéticos, obesos, con síndrome de resistencia a la insulina entre otros.

El FZ por el tamaño de partícula no es absorbido por el intestino, en ensayos realizados por nuestro equipo de investigación, se observó que en cerdos no hay absorción intestinal de FZ, debido al tamaño de las partículas (datos no mostrados). Parece ser que la glucosa y otros monosacáridos que no son absorbidos en la primera porción del intestino delgado por la fuerte unión al FZ, continúan hacia el tubo digestivo distal donde son objeto de transformaciones metabólicas por la acción de los microorganismos intestinales, ya que en los estudios toxicológicos realizados no se encontró una disminución del peso de los animales tratados con FZ. Los productos finales de estas transformaciones, pueden contribuir en el mantenimiento de la fisiología animal a través de otras rutas metabólicas distintas a la glucosa e impedir que el FZ, afecte el metabolismo general o el metabolismo energético de los animales como ocurre con la Acarbosa (122, 124, 125,126). El aumento de la actividad de las enzimas disacaridasas, observado en los experimentos realizados por González T. (34), pudiera manifestarse en una mejor digestión de los alimentos ingeridos por los animales y no ocurrir una pérdida de peso en los mismos.

Pensamos que el FZ provoca una disminución de la absorción intestinal de glucosa en una primera etapa a su paso por el tubo digestivo proximal, después que el animal ingiere el alimento, que se recupera en porción distal por acción de la flora intestinal sobre los carbohidratos, trayendo como consecuencia un almacenamiento más eficaz del azúcar como glucógeno hepático y por tanto, hay menor paso de glucosa del área esplácnica a la circulación periférica (123), que implica menor concentración en sangre en los períodos postprandiales, lo cual constituye el objetivo de cualquier medicamento en el tratamiento para pacientes diabéticos.

Pensamos que quizás un diseño en el cual la dosis de FZ se incrementara a 0,5 g /kg sin variar la concentración de glucosa administrada a 1g/kg de peso hubiera aportado resultados mas concluyentes.

3.3. Efecto de dosis única de Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) en perros Beagles.

En la figura 11 se muestra el comportamiento de las concentraciones de glucosa en sangre en los perros Beagles asignados como grupo control y los tratados con el FZ, después de recibir ambos grupos la carga de glucosa, durante los 180 minutos que duró el estudio. Puede apreciarse, que cuando los animales son tratados con el FZ a una dosis

de 1g/kg de peso, se reduce la biodisponibilidad de glucosa. Estos datos cumplieron con los criterios de normalidad y homogeneidad, establecidos para realizar un ANOVA.

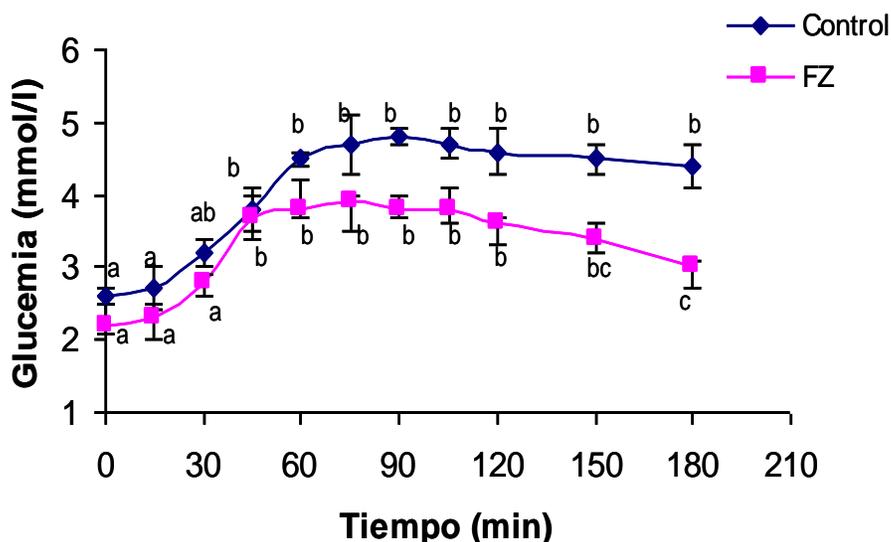


Figura 11. Cinética de la biodisponibilidad de glucosa sérica en perros Beagles (control y tratados con FZ) previa sobrecarga con glucosa (1g / kg de peso). [Las barras indican la desviación estándar de la media. Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)]

Los resultados muestran diferencias significativas de las concentraciones plasmáticas de glucosa entre el grupo bajo tratamiento y el grupo control, a partir de los 120 minutos y hasta los 180, aunque esta diferencia no fue significativa durante la primera hora del estudio.

Estos resultados demuestran que los perros eran normoglucémicos ya que los mecanismos de regulación, luego de un ayuno de doce horas, mantenían las concentraciones normales de glucosa en sangre. Del mismo modo se evidencia la regulación dinámica de la glucosa postestimulación ya que dos horas después de la sobrecarga de glucosa inicial (1g /kg de peso) las concentraciones plasmáticas de glucosa comienzan a mostrar una tendencia a la normalización, como describe Tirone en su estudio sobre la regulación de la glucemia (127).

En la tabla 6 se presentan los resultados del análisis de las curvas construidas con los valores medios de la glucemia en perros Beagles al grupo que se le administró FZ y sin este producto.

Tabla 6. Parámetros determinados a partir de las curvas de comportamiento de glucemia en perros Beagles.

	Control	Tratamiento con FZ
Área bajo la curva (mmol/L/min)	637,06 ± 39,2	523,34 ± 36,6 [*]
Tiempo de máxima concentración de glucosa en sangre (min)	115,19 ± 10,9	101,64 ± 10,3 [*]
Concentración máxima de glucosa en sangre (mmol/L)	5,79 ± 1	4,06 ± 0,6 [*]
Tendencia de subida de la curva (Ka)	0,035 ± 0,020	0,028 ± 0,010 ^{ns}
Tendencia de bajada de la curva (Kc)	0,013 ± 0,008	0,012 ± 0,005 ^{ns}

Nota: ^{*} Significación estadística, ^{ns} No significación estadística para $p < 0,01$. Según el ANOVA.

El hecho de que el área bajo la curva como se observa en la tabla 6, sea menor para el grupo de animales que son tratados con el FZ, con respecto a cuando no lo reciben, sugiere que esta sustancia limita el paso de la glucosa del intestino a la sangre. Se observa además, que cuando los animales reciben el FZ presentan concentraciones máximas de glucosa en sangre mucho menor (30%), que el grupo control y estas concentraciones máximas, se producen aproximadamente 15 minutos antes, como consecuencia de un retraso en la biodisponibilidad de la glucosa y una mejor utilización de esta por parte del animal.

Estos resultados sugieren que *in vivo*, FZ limita la biodisponibilidad de la glucosa cuando este se suministra al animal junto con una fuente de carbohidratos, que en esta ocasión está dada por la combinación de los carbohidratos del pienso y la glucosa incorporada en

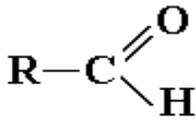
el experimento. Estos resultados sugieren que el FZ disminuye de manera significativa $p < 0,01$ y apreciable las concentraciones de glucosa en sangre en animales de experimentación mayores que las ratas y más cercanos al hombre también concordantes con los estudios anteriores y los resultados *in vitro* (10, 11, 44, 45) llevados a cabo por Concepción Rosabal.

Posible Mecanismo de Acción del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ).

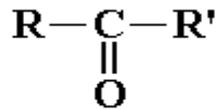
Para comprender lo que sucede en el sistema digestivo en cuanto a la disminución de la absorción de glucosa en los animales que han sido tratados con FZ, por vía oral, durante el período postprandial y la consecuente disminución de la glucemia, debemos remitirnos a los trabajos previos de Concepción-Rosabal (10, 11, 44, 45), en los cuales quedó demostrada la preferencia de adsorción de la glucosa por el FZ en presencia de fructosa y sacarosa, además la baja desorción, así como la notable estabilidad del complejo hasta los 200°C de temperatura. Estos resultados conducen al planteamiento de que la unión establecida entre la glucosa y el hierro, incorporado a la clinoptilolita pudiera ser descrita como un mecanismo fuerte de adsorción (quimiosorción), que se apoya con los ensayos cinéticos de absorción de glucosa, fructosa y sacarosa marcadas con ^{14}C en el tubo digestivo y la biodisponibilidad de glucosa, realizados en este trabajo en los epígrafes anteriores, donde se observó la preferencia de FZ por la captación de glucosa es decir la menor biodisponibilidad de la glucosa en sangre que pasa del sistema digestivo cuando la misma se ingiere junto a FZ, contrario a lo que sucede cuando se ingiere fructosa con FZ y en menor medida la sacarosa.

Templeton (128) estableció que los compuestos que contienen grupos funcionales insaturados, específicamente funciones del tipo aldehído o cetona tienen en el carbono o en el oxígeno del grupo carbonílico, un sitio apropiado para recibir ataques de agentes nucleofílicos.

Los aldehídos tienen el grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) al final de la cadena carbonada (R o R') o en una cadena lateral mientras que, las cetonas contienen el grupo carbonilo dentro de la cadena carbonada. Esquemáticamente esto puede verse así: Figura 12.



función aldehído



función cetona

Figura 12. Funciones aldehído y cetona.

Aunque los aldehídos y las cetonas presentan el mismo grupo funcional, el hecho de que en los aldehídos este se encuentre unido a una cadena carbonada y a un **H** mientras que en las cetonas está unido a dos cadenas carbonadas, provoca ciertas diferencias en la reactividad de aquellos compuestos que posean uno de estos grupos.

El mayor responsable de la reactividad química del grupo carbonilo es el átomo de oxígeno, ya que posee una mayor densidad de carga negativa libre $\delta (-)$ (128). También ocurre que el carbono carbonílico del aldehído se encuentra más deficiente de electrones que el de las cetonas, ya que recibe menos efectos inductivos por lo que reaccionará con mayor facilidad. Además, el grupo aldehído posee un menor apantallamiento a su nube electrónica (impedimento estérico) ya que uno de sus sustituyentes es el **H**, esto provoca que el estado de transición de sus reacciones esté menos impedido estéricamente que en las cetonas.

Para comprender con claridad la interacción de los sacáridos con agentes reductores en la figura 13 se representaron esquemáticamente las moléculas de glucosa y fructosa, y se señalaron las funciones aldehído y cetona que caracterizan a cada uno de estos carbohidratos.

El hierro incorporado en forma de FeSO_4 a NZ para obtener Fe^{2+} clinoptilolita (FZ) presenta una alta densidad de carga positiva libre $\delta (+)$, por lo que atacará preferentemente al oxígeno del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de la función aldehído de la glucosa. Durante este ataque, el hierro actúa como agente reductor por lo tanto se oxida y la molécula de glucosa se reduce teniendo lugar la interacción hierro glucosa. En la figura 13 se ilustra también el punto por donde pudiera ocurrir la interacción hierro-glucosa.

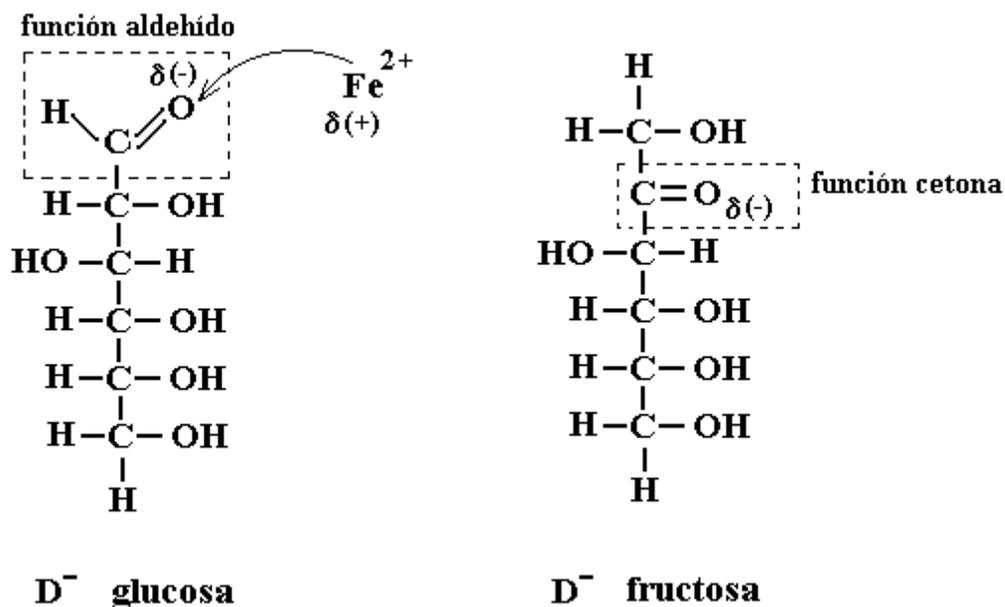


Figura 13. Representación esquemática de las moléculas de D-glucosa y D-fructosa.

Un mecanismo similar se pudiera postular para la unión con la fructosa, pero en este caso el grupo carbonilo se encuentra formando parte de la cadena carbonada (función cetona) lo que hace que la nube electrónica del oxígeno carbonílico esté más comprometida con el resto de la molécula y el ataque por parte del hierro sea más difícil que en el caso de la glucosa. Por tanto, la posición del oxígeno en la fructosa dificulta fuertemente su participación en el enlace con el hierro.

Este análisis justifica las diferencias entre los porcentajes de adsorción de glucosa y fructosa por FZ (128, 129). En el caso de la sacarosa, vemos que su molécula está formada por una unidad de glucosa y otra de fructosa unidas a través de un enlace glucosídico (figura 14).

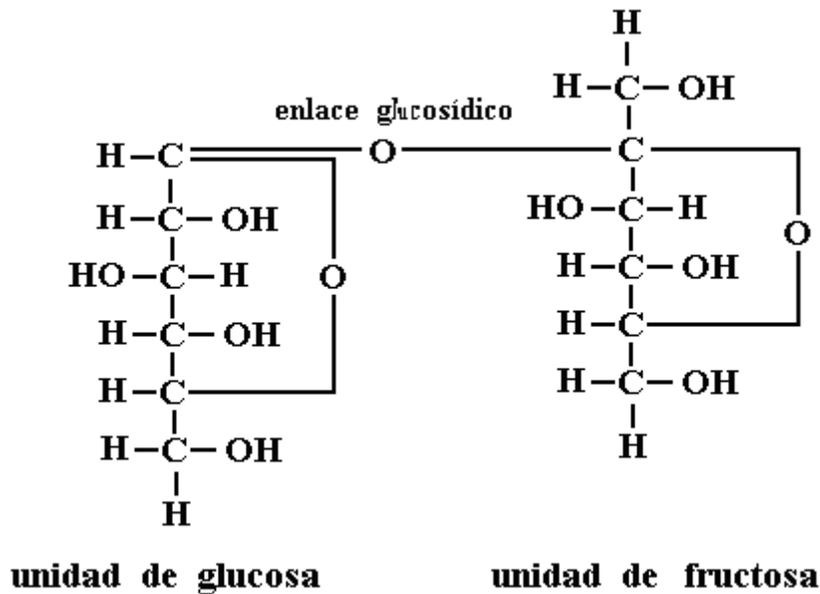


Figura 14. Representación esquemática de la molécula de sacarosa.

Se destaca el enlace glucosídico que forma la molécula de sacarosa a partir de una unidad de glucosa y otra de fructosa Figura 14. La hidrólisis en medio ácido de la sacarosa produce la separación de los monosacáridos que la forman. Esto implica que cuando se pone en contacto el Fe^{2+} -Clinoptilolita con una solución de sacarosa, debemos explicar el mecanismo de interacción entre FZ y el disacárido en función de los dos monosacáridos de forma independiente. Teniendo en cuenta dicha consideración, el mecanismo tentativo que proponemos sigue la línea de análisis descrita anteriormente para la glucosa y la fructosa.

Cuando ponemos en contacto Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) con una solución de sacarosa, es de esperar que capture más glucosa que fructosa debido a la marcada preferencia del FZ por la primera. Considerando este hecho, es lógico que el porcentaje de adsorción de glucosa sea superior al de fructosa.

Estos resultados evidencian la formación del llamado complejo Fe^{2+} -glucosa y sugieren que este podría ser uno de los mecanismos de acción de FZ, pero no descartamos que pueda no ser el único.

Generalmente en los alimentos ingeridos, los carbohidratos representan la principal fuente de energía de la mayoría de las dietas, cubriendo aproximadamente el 50% de los requerimientos energéticos diarios, los más importantes en la alimentación humana son el almidón y la sacarosa, que constituyen entre el 80 y el 90 % de los carbohidratos ingeridos. Del 60 al 70 % de esta cantidad, proviene del almidón y del 20 al 30 % de la sacarosa. Antes de ser absorbidos ambos deben ser escindidos mediante hidrólisis enzimática, la digestión intestinal los transforma en moléculas más pequeñas y finalmente en monosacáridos absorbibles. La glucosa es la forma química utilizable en el metabolismo energético, y su medición en plasma es índice del control metabólico instantáneo en la Diabetes Mellitus (control glucémico). El mayor porcentaje de glucosa proviene del almidón, polisacárido formado por unidades de glucosa y de sacarosa que se desdobla por la acción enzimática en glucosa y fructosa, esta última es absorbida en menor grado por el intestino humano (130).

La propiedad de FZ para adsorber glucosa en el tubo digestivo se puso de evidencia en los resultados de los estudios *in vitro*, farmacológicos y cinéticos realizados (10, 11, 44, 45).

Nuestros resultados en los estudios efectuados con perros y ratas confirman la propiedad del FZ para disminuir la biodisponibilidad de glucosa en sangre en los animales que ingirieron carbohidratos junto al FZ; que pudiera corresponder con la propiedad de FZ de captar glucosa en la primera porción del sistema digestivo, y por tanto, disminuir la absorción en la primera porción del intestino delgado, del monosacárido glucosa, mecanismo este que le confiere al producto una notable utilidad para controlar los niveles de glucosa en sangre en el periodo postprandial, y evidencia los beneficios que aportaría su empleo como medicamento antihiper glucemiante en pacientes diabéticos (figura 2-9).

Puede apreciarse que hay diferencias en los tiempos de los picos de máxima absorción para los azúcares estudiados, la absorción de la fructosa fue más lenta que la de la glucosa. La absorción de fructosa no sufre gran variación cuando esta se ingiere junto al FZ (Figura 7).

Todos estos resultados apuntan hacia una baja adsorción de la fructosa por el FZ cuyos niveles en sangre no se ven muy afectados por el producto como ocurre con la glucosa, este comportamiento es indicativo de la preferencia adsortiva del FZ para la glucosa que

podiera estar fundamentada por las diferencias en el mecanismo de interacción entre los iones Fe^{2+} del FZ y los oxígenos de los grupos carbonilo de las funciones aldehído y cetona de la glucosa y la fructosa, respectivamente.

La sacarosa que es escindida por las enzimas alfa glicosidasas intestinales en glucosa y fructosa se muestra menos afectada que la glucosa por el tratamiento con FZ (figura 8), aunque se observa su efectividad. El FZ adsorbe prioritariamente la glucosa coincidente con los estudios *in vitro* (10, 11, 44, 45).

3.4. Comparación del efecto del Fe^{2+} -Clinoptilolita (FZ) con un fármaco antihiper glucemiante de referencia (Acarbosa), en perros Beagles.

El efecto antihiper glucemiante de los distintos tratamientos (Acarbosa y FZ) utilizados en los perros, se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Glucemia en los diferentes grupos de perros estudiados, a los tiempos en que se realizaron las determinaciones.

Glucemia (mmol/L)					
Tiempo (min)	0	30	60	90	120
Grupo I Pienso (400 g)	4,72±0,59 ^a	4,8±0,54 ^a	4,91±0,69 ^a	4,4±0,62 ^a	3,92±0,64 ^a
Grupo II Pienso + Sacarosa (50 g)	4,5±0,72 ^a	5,97±1,16 ^b	5,47±0,81 ^b	5,3±0,77 ^b	4,18±0,49 ^a
Grupo III Pienso + Sacarosa + Acarbosa 100mg	4,1±0,59 ^a	4,27±0,40 ^c	3,99±0,43 ^a	3,85±0,45 ^a	4,19±0,39 ^a
Grupo IV Pienso + Sacarosa + FZ (5g)	4,1±0,59 ^a	4,8±0,91 ^c	4,43±0,90 ^c	4,2±0,62 ^c	4,67±0,44 ^a
Grupo V Pienso + Sacarosa + Acarbosa + FZ	3,9±0,60 ^a	4,35±0,80 ^c	4,4±0,90 ^c	4,01±0,80 ^c	3,8±1,00 ^a

Nota: Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK para $p < 0,05$. Los valores de concentraciones se expresan como (Media±Desviación Estándar)

Se evidenció que todos los grupos de animales que recibieron el fármaco o el FZ, individualmente o en forma combinada presentaban diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo II a partir de los 30 minutos. El grupo I que solo recibió el pienso, sirvió

de referencia para observar el comportamiento normal de la glucemia después de la ingestión de alimento sin sobrecarga de glucosa, siempre estuvo por encima de los grupos III, IV y V, que se le administraron los diferentes tratamientos. El grupo II estuvo sujeto a una hiperglucemia inducida por una sobrecarga oral de glucosa sin tratamiento con FZ o Acarbosa.

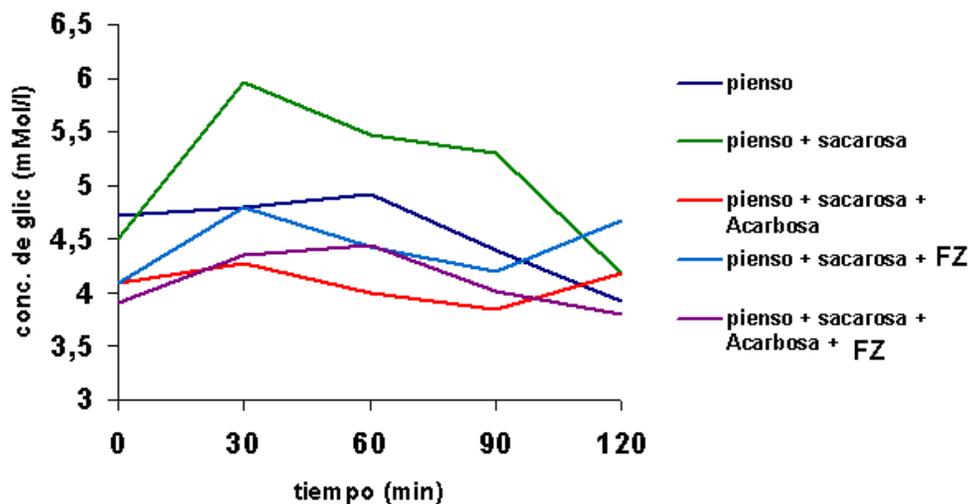


Figura 15. Curvas medias de glucemia de cada grupo de perros en los diferentes tiempos de las extracciones.

En la figura 15 se observan las curvas medias de glucemia post-estimulación de cada grupo. Los grupos III, IV y V que ingerían los fármacos presentaron las curvas con valores más bajos. Como se observa en la figura 16, donde se muestran los porcentajes de disminución de cada grupo con respecto al grupo II, control positivo, los porcentajes de disminución fueron 72, 52 y 60 respectivamente. Al aplicar la prueba SNK se demostró que todos los grupos tratados con las sustancias antihiper glucemiantes, mostraban una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo II. ($p < 0,05$ Grupos III, IV y V comparados contra grupo II).

Los inhibidores de las alfa Glucosidasas (AGIs) están entre los medicamentos disponibles que impiden la degradación de glucosa. La enzima alfa glucosidasa esta localizada en el borde del cepillo del intestino delgado y es requerida para la degradación de

carbohidratos complejos en monosacaridos absorbibles. Los AGIs se enlentecen, aunque no impiden, la absorción de los carbohidratos ingeridos, haciendo menor el pico de la glucemia postprandial mientras que la insulina alcanza el máximo efecto.

Existen tres investigaciones que soportan una evidencia cuya fuerza tiene el máximo nivel. Meneilly y cols. (64), estudiaron 45 pacientes diabéticos de tipo 2 con fracaso a tratamiento dietético. Los pacientes que recibieron Acarbosa en relación con los que recibieron placebo mostraron una reducción media en la glucosa plasmática en ayunas de 13 mg/dl (10%), y de 45 mg/dl (26%) en la glucemia dos horas post-estimulación. La Hb A1c tenía unos valores absolutos medios inferiores en 0,8% (descenso del 10%), y los pacientes que recibieron Acarbosa mostraron un incremento en la sensibilidad a la insulina. Hasche y cols. (65) mostraron tras dos años de seguimiento de 60 pacientes con diabetes tipo 2 y con fracaso al tratamiento nutricional, un descenso en los valores de HbA1c de 0,9% mayor en los que recibieron Acarbosa en relación con los que recibieron Placebo. Esto permitió que el 89% de los pacientes que recibieron Acarbosa, en relación al 49% de los que recibieron Placebo obtuvieran un índice de respuesta considerado óptimo por el valor absoluto de HbA1c alcanzado. Calle (131) demostró en pacientes con diabetes de tipo 2, diagnosticados con sobrecarga oral de glucosa, por lo tanto en una fase clínica muy precoz, un descenso en la glucosa plasmática en ayunas de 16 mg/dl y en la Hb A1c de 0,2%.

Cuando se desarrolla un nuevo producto farmacológico éste debe lograr un efecto igual o superior al de aquellos medicamentos de similar mecanismo de acción, o poseer menos efectos secundarios indeseables, y mostrar un balance costo beneficio superior.

En el presente experimento se comparó el efecto de nuestro producto FZ, con la Acarbosa reconocida en el mercado farmacéutico como antihiper glucemiante.

Como parece indicar, FZ logra disminuir los niveles de glucemia mediante un mecanismo de quimioadsorción de glucosa, o sea, mediante un mecanismo diferente a los postulados para los antihiper glucemiantes conocidos (inhibidores de las enzimas alfa glucosidasas intestinales) que se mantienen en el mercado como fármacos complementarios en el tratamiento de la hiper glucemia.

En un estudio en el que se evaluaron los efectos de la Acarbosa en el tratamiento de la diabetes, 52 pacientes diabéticos de tipo 2 recibieron Acarbosa durante dos meses, lo que

produjo una disminución de la glucemia postprandial en un 26%, en relación con el período precedente, y se redujeron las concentraciones de hemoglobina glucosilada, glucosuria, triglicéridos y el peso corporal en los casos que presentaban una diabetes mal controlada (131).

Los resultados de la comparación del efecto antihiper glucemiante de FZ con el de la Acarbosa en perros, muestran que ambos productos tienen un efecto bastante similar ya que logran una disminución de las áreas bajo las curvas de glucemia vs. tiempo de 52 % y 72 % respectivamente (tabla 7, figuras 15 y 16). Habría que tener en cuenta que la dosis que se administró de Acarbosa a los perros fue más de dos veces superior a la dosis sugerida en humanos.

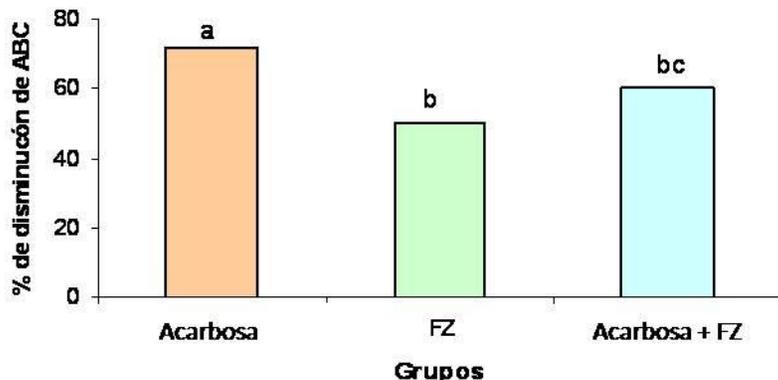


Figura 16 Porcentajes de disminución de las áreas bajo la curva de los grupos de perros tratados respecto al grupo II, que ingirió el pienso con sacarosa como control positivo. [Las letras no comunes indican diferencias significativas según el ANOVA y la prueba post hoc SNK ($p < 0,05$)]

Según nuestro estudio, en los animales tratados con Acarbosa y FZ, de manera individual o combinados (grupos III, IV y V) se produjo una disminución importante de los valores de las áreas bajo de la curva de glucemia, cuando se compararon contra el grupo II, demostrándose que en estos tres grupos de perros bajo tratamiento que recibieron Acarbosa o FZ, se obtuvo una reducción en las concentraciones de glucemia.

FZ presentó un efecto menor que la combinación de los dos medicamentos y que la Acarbosa sola, mientras que el efecto de la combinación de la Acarbosa con el FZ no

produce un efecto superior al obtenido por la Acarbosa administrada de forma independiente. No tenemos una explicación bien fundamentada de estos resultados, pensamos en una posible interferencia del FZ sobre la Acarbosa, que impida su acción inhibitoria sobre las enzimas disacaridasas. Parece que uno de los dos compuestos interfiere en el mecanismo antihiper glucemiante del otro, que pudiera también corresponder con una adsorción de la Acarbosa por el FZ.

Los resultados obtenidos en este estudio son alentadores, FZ es una sustancia que recién comienza a demostrar su efecto antihiper glucemiante *in vivo*, aún no ha sido estudiado su efecto en humanos, sin embargo estos resultados experimentales dejan sentado que en el futuro su empleo, solo o combinado con medicamentos hipoglucemiantes (formas en que se emplea la Acarbosa) si no existen interferencias entre ellos, puede ser importante para combatir las afecciones relacionadas con la hiperglucemia.

La combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción, se utiliza en la práctica médica con el fin de lograr mayor reducción de los niveles de glucosa en sangre. Los resultados experimentales demuestran que la aplicación de la combinación de estos productos (Acarbosa y FZ), para disminuir la glucemia, logran un efecto que resulta menor que el empleo de la Acarbosa sola (87).

Los medicamentos conocidos como hipoglucemiantes orales y la insulina son útiles en el tratamiento de los pacientes que presentan concentraciones elevadas de glucosa en sangre, disminuyen la glucemia, aunque en muchos casos no son capaces de mantener al paciente bien controlado, sobre todo en los períodos postprandiales. La combinación de ellos con inhibidores de las enzimas glucosidasas intestinales, conocidos como antihiper glucemiantes o adsorbentes de glucosa como el FZ, favorece la disminución de las concentraciones de glucosa después de la ingestión de alimentos y en muchos casos, posibilitan la reducción de la dosis de hipoglucemiantes orales o insulina (87).

En la actualidad existen diferentes medicamentos que disminuyen las concentraciones de glucosa en sangre que son utilizados en humanos, mientras que otros fármacos con un mecanismo de acción similar, parecido o no, a las ya existentes pero con menos efectos

secundarios, más eficaces o con menor costo, aparecen en distintas etapas de estudio, entre estos el FZ.

El Fe²⁺-Clinoptilolita se obtiene a partir de un mineral, mediante procedimientos que no precisan grandes inversiones en recursos y los resultados obtenidos en animales de experimentación, muestran que actúa sobre las glucemias postprandiales con una eficacia parecida a la Acarbosa, una sustancia que requiere para su obtención un proceso de síntesis por bioingeniería. Esto le confiere al derivado zeolítico una notable ventaja, sumado a que la Acarbosa y otros fármacos de acción similar, no se comercializan en el país.

3.5. Evaluación de otros efectos biológicos del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) en animales de experimentación.

3.5.1. Efecto del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) sobre las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos en conejos.

La tabla 8 muestra los valores obtenidos como resultado de las mediciones en sangre de las diferentes variables, expresados en mmol/L, para cada grupo de conejos antes y después del tratamiento.

Tabla 8. Concentraciones séricas de las variables estudiadas antes de comenzar el período de tratamiento con FZ y a las siete semanas en conejos.

Parámetro	Tiempo	Grupo I (Talco 2g/kg)	Grupo II FZ (0,5g/kg)	Grupo III FZ (1g/kg)	Grupo IV FZ (2g/kg)
Colesterol Total (mmol/l)	t ₀ días	0,89±0,07	0,81±0,06	0,85±0,07	0,82±0,09
	t ₇ semanas	1,2±0,03	1,1±0,02	0,94±0,02	1,1±0,02
Colesterol HDL (mmol/l)	t ₀ días	0,41±0,05	0,51±0,08	0,51±0,06	0,56±0,07
	t ₇ semanas	0,6±0,02	0,5±0,05	0,54±0,03	0,71±0,09
Triglicéridos (mmol/l)	t ₀ días	0,47±0,03	0,58±0,05	0,32±0,06	0,38±0,09
	t ₇ semanas	0,46±0,03	0,36±0,02	0,242±0,01	0,23±0,03
Glucemia (mmol/l)	t ₀ días	4,32±0,9	4,14±1,0	4,58±0,7	4,67±0,9
	t ₇ semanas	6,6±1,0	4,0±0,7	4,4±0,8	4,2±0,7
TGP (UI)	t ₀ días	27,5±6,0	40,1±3,0	69,6±7,0	67,3±7,0
	t ₇ semanas	57,0±10,0	43,0±6,0	36,4±5	45,66±7
Creatinina (μmol/L)	t ₀ días	152,5±18,0	144,0±12,0	143,3±14,0	141,3±17,0
	t ₇ semanas	113,0±17,0	133,0±15,0	101,6±12,0	95,83±9,0
F A (UI)	t ₀ días	183,0±21,0	193,0±15,0	216,2±19,0	207,0±15,0
	t ₇ semanas	232,0±31	210,0±17,0	229,0±14,0	213,3±21,0

Nota: Las concentraciones están expresadas como (Media±Desviación estándar). **FA-** Fosfatasa Alcalina. Las concentraciones de los suministros de Lactosa talco y FZ fueron por kg de peso del animal (0,5, 1y 2g).

Test ANOVA: ns

Se evidenció que no existen diferencias significativas de las mediciones antes y después del período de tratamiento con FZ según el ANOVA y la prueba post hoc SNK. Se observó una ligera disminución no significativa de los niveles de triglicéridos después del tratamiento.

Los antihiper glucemiantes son fármacos que retardan o disminuyen los incrementos de glucosa en sangre después de la ingestión de alimentos ricos en carbohidratos, por lo que

está reportado que tienen efecto indirecto sobre los niveles séricos de las lipoproteínas (16, 125, 131-133)

Algunas alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas son reconocidas como factores de riesgo de aterosclerosis y de ahí, la importancia de estudiar nuevos preparados con posibilidades (como es el caso de las zeolitas) de tener algún efecto regulador sobre el metabolismo de estas partículas. Se esperaba una acción favorable del FZ, sobre la disminución de las concentraciones de colesterol en la sangre de conejos tratados, como se observó anteriormente con la Colestina (38), derivado zeolítico que se obtiene de la misma fuente que el FZ, pero que contiene en su estructura iones Ca^{2+} en lugar de Fe^{2+} . Sin embargo las dosis de FZ administradas no causaron efecto significativo sobre los niveles de colesterol en los grupos de conejos estudiados (38), ya que FZ y Colestina son productos diferentes, que poseen mecanismos de acción diferentes.

Como se observa en la tabla 8 hubo un incremento ligero no significativo de los niveles de colesterol total, en los grupos de conejos tratados con FZ después de los 42 días y para ello no contamos con una explicación satisfactoria. El peso de estos animales tampoco varió significativamente, pensamos que estos animales estaban algo envejecidos al comienzo del estudio (la edad) pudo haber sido la causa de esta elevación.

Los triglicéridos son otro grupo de moléculas lipídicas cuya elevación en sangre tiene un efecto perjudicial sobre la pared arterial, que facilita el desarrollo de la aterosclerosis. Las concentraciones de triglicéridos disminuyeron de forma no significativa, este resultado puede deberse a la disminución de la glucemia en sangre después de la ingestión del alimento (disminución de los picos glucémicos postprandiales), ya que es conocido que el exceso de glucosa en sangre se transforma en grasas (triglicéridos) para su almacenamiento en los lugares de depósito, tanto en los animales como en el humano, aunque se sabe que el derivado zeolítico conocido por Colestina (38,135,136), no actúa de esta forma sobre los triglicéridos. El efecto del FZ pudiera estar dado por el efecto sobre la glucemia postprandial como se reporta con la Acarbosa (65). El FZ disminuye los picos glucémicos postprandiales y posiblemente contribuye al control metabólico del animal que lo ingiere, facilitando el empleo de las grasas de la sangre para la producción de energía, también podría disminuir la liberación de insulina por el páncreas y por este mecanismo frenar la síntesis de triglicéridos.

Los resultados del estudio muestran que los valores de glucemia se mantienen sin variación, tanto entre los grupos, como entre “antes y después” del tratamiento, lo que es un resultado hasta lógico, ya que el efecto del FZ está vinculado a la absorción intestinal de glucosa, disminuyendo el pico glucémico que se produce principalmente en los períodos postprandiales y los conejos estaban en ayunas más de 12 horas, aunque si se hubiera estudiado la hemoglobina glucosilada (HbA1c) que mide el control glucémico durante un espacio mas largo de tiempo anterior, tal vez se hubiera observado la diferencia.

El resto de las variables medidas (TGP, Creatinina y FA) no mostraron variación, podemos afirmar según estos resultados que no hubo efecto del FZ sobre ellos que expresan el funcionamiento hepático o renal (Tabla 8), que pudiera conllevar otro efecto colateral o adverso sobre la salud de los perros, que afectara la seguridad del medicamento.

3.5.2. Efecto del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) sobre algunas variables que evalúan el mecanismo de la coagulación en perros.

Los resultados obtenidos en lo que se refiere a niveles de glucemia en los perros de los grupos control y tratados con FZ al 2% durante 18 días, se presentan en figura 17.

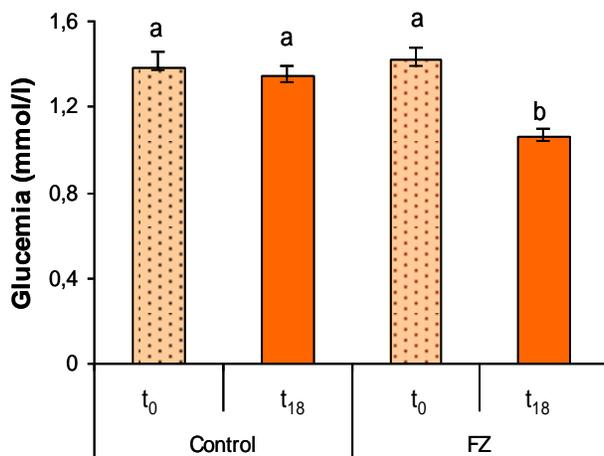


Figura 17. Concentraciones medias de glucosa en sangre en ayunas, en los dos grupos de perros estudiados, antes y después del tratamiento con FZ durante 18 días. [Las barras indican la desviación estándar

de la media. Las letras no comunes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica U de Mann–Whitney ($p < 0,05$]

Al analizar estas variables en cada grupo, al inicio y final del ensayo, se encuentran valores de glucemias ($p < 0,05$] más bajas en el grupo de perros que recibió FZ al 2 %. En la Figura 18 se presentan los resultados del tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada con caolín (TPTK) de los grupos control y tratados al inicio y al finalizar el ensayo. Al comparar los resultados de estas pruebas en cada grupo “antes y después” del período que duró la investigación, no se encontró diferencias significativas; tampoco hubo diferencias al comparar cada uno de estos parámetros, al inicio y final del ensayo, entre los 2 grupos.

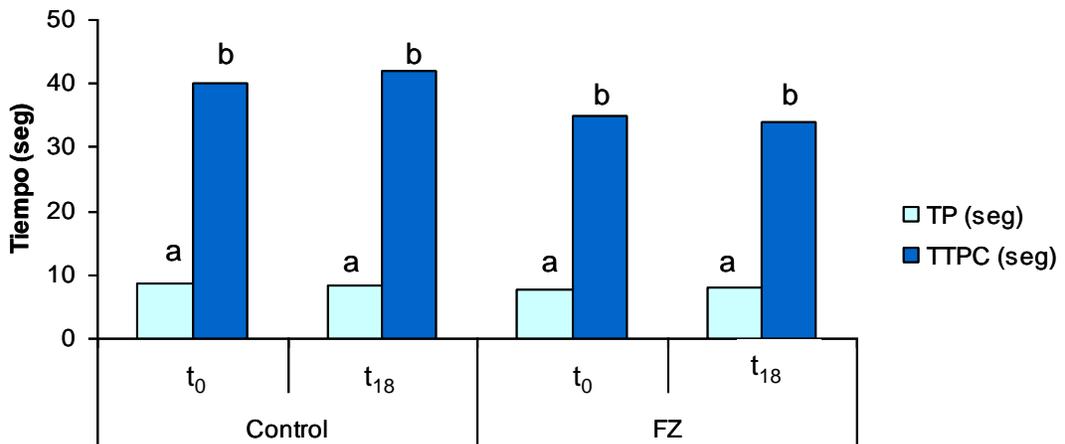


Figura18. Valores de los tiempos de coagulación estudiados, en los dos grupos de perros) antes y después de 18 días. [Las letras no comunes indican diferencias significativas según la prueba no paramétrica U de Mann–Whitney ($p < 0,05$]

Los valores del tiempo de protrombina (TP) y del tiempo parcial de tromboplastina activada con caolín (TPTK), antes y después de la administración del FZ se mantienen muy similares.

La glucemia mostró una variación significativa (fig 17) cuya explicación puede estar dada por el efecto de los antihiper glucemiantes al actuar sobre las glucemias postprandiales, actúan también sobre el control glucémico (pueden mejorarlo a largo plazo) como sucede con la Acarbosa, comprobado por Hb glucosilada en humanos.

Numerosas especies microbianas colonizan el aparato digestivo. El estómago es casi estéril, pues solo contiene bacilos de la fermentación láctica, lo que se explica por la fuerte acidez del jugo gástrico de acción antipéptica. A partir del intestino delgado comienza a desarrollarse una microbiota con gérmenes aerobios y anaerobios fundamentalmente en el intestino grueso donde el número de microorganismos es enorme. (135,136).

La acción de los gérmenes sobre las proteínas y los carbohidratos produce diferentes sustancias, por ejemplo las vitaminas, por tanto la microbiota intestinal participa de forma activa en las funciones fisiológicas de los animales.

Al valorar el efecto del FZ sobre estos dos parámetros que valoran los mecanismos de la coagulación con las mediciones que exploran las dos vías (intrínseca y extrínseca) figura 18, no se encontró variación significativa en los mismos, que implique afectación sobre la cascada de reacciones enzimáticas que constituyen dichos mecanismos, a la dosis administrada por vía oral a los animales. La adsorción de la glucosa por FZ ocurre en el intestino delgado a medida que los carbohidratos complejos se van degradando por la acción de las enzimas glucosidasas intestinales, al no ser absorbido por la mucosa intestinal, el complejo glucosa-FZ continúa hacia el intestino grueso donde podría interferir en las diferentes reacciones y síntesis que ocurren fisiológicamente en este lugar (136). Una posible acción de FZ a tener en cuenta en esta zona, sería la inhibición del crecimiento bacteriano, lo que impediría que se llevara a cabo la síntesis que realizan estas bacterias de algunas vitaminas liposolubles, limitando su posterior absorción a través de la mucosa intestinal; entre ellas la vitamina K. Como consecuencia de esta deficiencia de vitamina K podría verse afectada la síntesis de los factores de la coagulación vitamina K dependientes, lo que se traduce en un alargamiento del tiempo de protrombina, fenómeno similar al que se observa cuando se emplean anticoagulantes orales conocidos como "antivitaminas K". Se ha reportado que el uso de dosis altas de sequestradores de ácidos biliares en los humanos, trae como consecuencia un alargamiento del tiempo de protrombina (134).

La hipótesis acerca de que los derivados zeolíticos ejerzan alguna acción en el intestino que provoque algunas consecuencias sobre la coagulación, está fundamentada por resultados observados con otro derivado zeolítico, la Colestina, que produjo un alargamiento significativo en el tiempo de protrombina con una dosis extremadamente alta

y una tendencia al alargamiento de este tiempo de coagulación con todas las dosis ensayadas, que pudiera estar relacionado con la adsorción de vitamina K en dependencia de la dosis de Colestina administrada (38, 134,135).

Al tener en cuenta lo antes expuesto, se podría esperar que con el FZ ocurriera un alargamiento en el tiempo de protrombina, pero en el estudio no se encontró efecto sobre los tiempos de coagulación, al emplear la dosis de FZ efectiva para disminuir los picos glucémicos postprandiales, o sea que FZ no parece influir en la fisiología de la microbiota normal del intestino por lo menos con respecto a la coagulación en estos animales.

3.6. Estudios toxicológicos realizados a Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ).

3.6.1. Toxicidad aguda del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ).

El resultado de esta evaluación, no demostró alteraciones clínicas, ni de comportamiento, como tampoco, fueron evidenciadas alteraciones anatomopatológicas en órganos y tejidos de las especies bajo tratamiento al compararlas con las observaciones hechas en el grupo control al sacrificio.

En ninguno de los grupos evaluados se presentó mortalidad.

Estos resultados permiten concluir que el FZ no clasifica como sustancia tóxica, atendiendo a lo establecido en las pruebas de toxicidad aguda.

3.6.2. Evaluación mutagénica del Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ).

3.6.2.1 Ensayo citogenético de la médula ósea en ratas CENP: SPRD.

En la tabla 9 se exponen los resultados obtenidos. No se aprecian diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos tratados con FZ y el grupo control negativo (Carboximetilcelulosa) y por el contrario se encontraron diferencias ($p < 0,05$) con el grupo control positivo (Ciclofosfamida).

Tabla 9. Número de aberraciones cromosómicas por grupo de tratamiento y sexo combinados, en células de la médula ósea en ratas.

Grupo	n	No Células	No Aberrac.	Aberrac. por Célula	Total de aberraciones X ± DE
Control negativo	10	500	11	0,02	2,20±2,39
Control positivo	10	500	206*	0,41*	21*±2,28
FZ	10	500	10	0,02	2,00±2,11

n: Número de animales X: Media. DE: Desviación estándar

* Significativamente diferente de los grupos restantes, según ANOVA con una significación de $p < 0,05$.

Con los resultados obtenidos, en las concentraciones de FZ utilizadas y las condiciones de la investigación no se detectó efecto mutagénico sobre los cromosomas de la médula ósea de la rata, por lo tanto se concluyó que el FZ en el nivel de dosis aplicado, no posee efectos mutagénicos.

3.6.2.2. Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratones.

En la tabla 10 se expone el índice de toxicidad y la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN). Al analizar los resultados no se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos tratados con FZ y el grupo control (Carboximetilcelulosa) con relación al incremento de eritrocitos policromáticos micronucleados. No se evidenció efecto citotóxico en la relación eritrocitos policromáticos/normocromáticos.

Tabla 10. Porcentaje de micronúcleos e índice de toxicidad de los grupos controles y tratados, en médula ósea de ratones machos.

Grupo	n	No Erit. Policro.	% MN+ DE	Ind Tox ± DE
Control negativo	5	5000	0,08 ± 0,08	2,17 ± 0,20
Control positivo	5	5000	9,94 ± 7,73	0,48 ± 0,22*
FZ	5	5000	0,10 ± 0,07	2,17 ± 0,21

* Diferencias significativas ($p < 0,05$), según el ANOVA

Tabla 11. Porcentaje de micronúcleos e índice de toxicidad de los grupos controles y tratados, en médula ósea de ratones hembras.

Grupo	n	No Erit Policro	% MN ± DE	Ind Tox ± DE
Control negativo	5	5000	0,12±0,08	2,34± 0,09
Control positivo	5	5000	9,94±7,73*	0,48 ± 0,22*
FZ	5	5000	0,08±0,08	2,35±0,11

* Diferencias significativas ($p < 0,05$) * Diferencias significativas ($p < 0,05$), según el ANOVA.

Se encontraron diferencias ($p < 0,05$) con el grupo control positivo (Ciclofosfamida) para ambos grupos de ratones.

Por todo lo anterior expresado se puede concluir que en las condiciones que se realizó el estudio y la dosis aplicada FZ no presentó efectos clastogénicos ni citotóxicos sobre la médula ósea del ratón.

3.6.2.3. Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide en ratones CENP: NMRI.

En la tabla 12 se exponen el porcentaje de anomalías y el total de células/mL. No se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo tratado con FZ y el grupo Control negativo para las diferentes categorías de anomalías (amorfa, gancho y banana), así como para la relación del número total de células/mL.

Tabla 12. Porcentaje de anomalías y concentración Espermática ($\times 10^6$ ml) de la cabeza del espermatozoide en ratones.

Espermatozoides						
Grupos	Normales	Amorfos	Sin gancho	Forma de Banana	Total de anormales	Concentración
Control negativo	95	2,16 \pm 0,26	1,80 \pm 0,23	1,02 \pm 0,22	4,98 \pm 0,27	12,5 \pm 0,20
Control positivo	84,71*	8,63 \pm 1,23	3,43 \pm 0,84*	3,23 \pm 0,64*	15,29 \pm 1,06*	7,60 \pm 0,56*
Glicolit	95,9	1,84 \pm 0,40	1,06 \pm 0,37	0,98 \pm 0,24	3,88 \pm 0,58	12,1 \pm 0,92

* Diferencias significativas ($p < 0,05$), según el ANOVA.

Otro aspecto a tener en cuenta es que se le ha adjudicado a las zeolitas y algunos feldespatos propiedades cancerígenas, que solo se han visto en zeolitas sintéticas, debido a su estructura fibrilar capaz de afectar las membranas mucosas con las cuales interacciona. Este no es el caso de la clinoptilolita (FZ) que no posee esta estructura y que hasta ahora los estudios toxicológicos realizados no han mostrado alteraciones mutagénicas.

Esto puede explicarse además por las características estructurales de la sustancia, el tamaño de partícula utilizado no es absorbido por el intestino, no se absorbe al nivel de las

vellosidades intestinales y no pasa a la circulación por lo que no debe poseer efectos sistémicos en el organismo animal o humano.

Los conocimientos científicos actuales indican que numerosos productos poseen propiedades mutagénicas que implican un riesgo potencial para las generaciones futuras y un riesgo potencial de cáncer para la generación actual, el FZ es una zeolita natural a la cual no se le ha reportado efecto cancerígeno, no ocurre igual con las zeolitas artificiales y con algunos feldspatos con los que esta emparentado estructuralmente por esto es importante realizar un estudio de las posibles modificaciones del genoma mediante estudios toxicológicos (88,89).

Entre las proyecciones futuras se tendrán en cuenta estudios toxicológicos más largos que verifiquen estos aspectos, así como los posibles efectos secundarios sobre el aparato gastrointestinal, (como obstrucción, diarrea, distensión) que se pudieran observar en la administración sistemática del producto y que se podrían ver en estudios toxicológicos subcrónicos y crónicos.

También se debe tener en cuenta la definición expresada de “adsorción selectiva” en estudios *in vitro*, pues se supone que esta adsorción selectiva no es exclusiva, ni específica para la glucosa en el tracto gastrointestinal, para esto es necesario contar con un grupo de sustancias exploradas *in vitro* y en animales, para conocer cuales se adsorben o no se adsorben y en que cantidad. Si se supone que se administra junto con los alimentos se debe conocer, que incorpora y elimina con las heces y que no elimina sustancias importantes para la nutrición, como vitaminas, minerales y oligoelementos.

Se observaron diferencias significativas con relación al control positivo (Achrilamida) para las diferentes categorías de anormalidades así como número total de células/mL.

Bajo las condiciones utilizadas en el estudios y el nivel de dosis empleado, el FZ no mostró efectos genotóxicos, ni citostáticos sobre las células espermáticas del ratón.

Se hace necesario el conocimiento de la toxicología de un producto farmacéutico y la seguridad del mismo para ser usados en humanos, debido a que pueden implicar un riesgo potencial para la salud o la vida de una persona, por lo que es importante identificar aquellos productos que presenten tales propiedades.

El FZ ha manifestado efecto antihiper glucemiante en animales de experimentación y se hace necesario su evaluación toxicología, la toxicología aguda subcrónica y crónica, así

como la mutagénesis cuando se piensa utilizar por periodos de tiempo largo y a medida que vaya mostrando su inocuidad seguirá a otras etapas de estudios toxicológicos. Como FZ es un producto con potencial uso en la terapia humana debe pasar por estas pruebas. Los resultados obtenidos sugieren que el FZ no clasifica como sustancia tóxica, atendiendo a lo establecido en pruebas de toxicidad aguda (118). Un estudio de toxicidad subcrónica realizado a la Zeolita natural por Tillán y col. tampoco mostró poseer este tipo de toxicidad en la sustancia de origen. No se encontró efecto mutagénico, clastogénicos, ni citotóxicos sobre la médula ósea del ratón (88,89). Tampoco mostró efectos genotóxicos, ni citostáticos sobre las células espermáticas del ratón (119-121).

En los estudios preliminares realizados hasta el presente (de seguridad, toxicológicos agudos y de mutagénesis no mostraron efectos negativos sobre la salud de los animales estudiados.

El FZ no produce alteraciones metabólicas debido a la captura y la disminución de la glucosa disponible para ser absorbida por el tubo digestivo.

Estos resultados aportan datos sobre la inocuidad de producto FZ al no inducir alteraciones sobre el genoma de los animales y su posible uso en pacientes necesitados del mismo sin riesgo de aparición de afecciones cancerígenas.

Conclusión del capítulo.

Como se observa en los resultados obtenidos al evaluar el efecto antihiper glucemiante de Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) mediante estudios farmacológicos, respetando las normas internacionales establecidas, para productos naturales con posibilidades de uso en la práctica médica, (92-94,110,121) se concluye que:

Es un estudio parcial, no es un estudio terminado, porque el conocimiento es infinito y se aborda solo una parte.

FZ es un nuevo material desarrollado a partir de una zeolita natural purificada, (clinoptilolita), intercambiada con Fe⁺², que posee un marcado efecto de adsorción preferencial de glucosa en solución y en el tubo digestivo. Esta acción, según el mecanismo descrito, no aparece reportada en la literatura sobre medicamentos destinados a pacientes diabéticos. Este producto pudiera ser útil en el control metabólico de pacientes diabéticos y las complicaciones asociadas a los estados de hiperglucemia.

Las cualidades no tóxicas de este nuevo material, además de la ventaja económica en el proceso de obtención y producción, han permitido proponer el diseño de un nuevo principio activo zeolítico destinado al tratamiento de pacientes diabéticos. Por lo que se aprueba la hipótesis presentada en este documento.

CONCLUSIONES.

De los resultados de los estudios realizados al FZ se derivan las siguientes conclusiones:

- Se demostró que FZ posee efecto antihiper glucemiante en animales de experimentación, y que es un producto seguro. Lo que permite considerarlo como un producto natural posible candidato a medicamento para el tratamiento de pacientes diabéticos y disglucémicos.
- La administración oral de diferentes dosis de FZ sobre las concentraciones de glucosa en sangre de animales de experimentación con hiperglucemia produce la disminución de la biodisponibilidad de la glucosa de estos animales. Se estableció la dosis efectiva media (DE₅₀) y la dosis máxima (DM) de FZ en ratas.
- El estudio comparativo de FZ con el fármaco de referencia Acarbosa no evidenció diferencias en perros, lo que confirma el efecto antihiper glucemiante de FZ.
- FZ no mostró tener efecto sobre los niveles de colesterol y triglicéridos del plasma en los animales estudiados.
- Según los estudios de toxicología aguda y mutagénesis realizados, así como los valores determinados de las variables relacionadas con la coagulación de la sangre en animales, FZ es seguro en las condiciones y la dosis utilizada.

RECOMENDACIONES y PROYECCIONES.

A partir de los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede establecer que el Fe²⁺-Clinoptilolita (FZ) posee efecto antihiperglucemiante *in vitro* y en los estudios preclínicos realizados en modelos animales. Esta propiedad es dependiente de la relación dosis – efecto. Estos resultados podrían avalar el proceso de obtención del producto con una forma terminada con dosis de aplicación farmacológicamente activa en cuanto a la actividad antihiperglucemiante, estrictas para cada afección y que sean aceptables al paladar, para así acercarnos a la obtención de nuevas opciones de productos naturales, aplicables al tratamiento de las distintas enfermedades metabólicas como la Diabetes Mellitus y sus complicaciones.

Estudios futuros a corto plazo son necesarios para dilucidar aspectos toxicológicos que ayuden a eliminar cualquier duda de su utilización en pacientes.

1. Continuar desarrollando los estudios preclínicos y toxicológicos establecidos por las autoridades regulatorias nacionales e internacionales correspondientes de esta fase, que conlleven al registro médico del producto natural para uso farmacológico con acción antihiperglucemiante, que puede ser destinado al tratamiento de pacientes que cursan en diversas afecciones con alteraciones de la glucemia; como la Diabetes Mellitus, la obesidad, el síndrome metabólico y la insulino-resistencia.
2. Realizar los estudios tecnológicos para la formulación del fármaco que empleé FZ como principio activo.
3. Continuar las investigaciones del producto en las siguientes fases de estudios clínicos.
4. La introducción en la práctica médica del producto terminado, en los pacientes meritorios de este tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros. Médicos. Estadísticas de Salud. Situación de Salud en Cuba. Indicadores Básicos. 2011. [Internet] 2011. [Citado 4 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>
2. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2011 dic 20; 35(Supplement_1):S11–S63.
3. Domínguez Alonso E, Seuc Jo A, Díaz Díaz O, Aldana Padilla D. Esperanza de vida saludable asociada a la diabetes en Cuba: años 1990 y 2003. *Revista Cubana de Endocrinología*. 2010 abr; 21(1):13–34.
4. Björk S. The cost of diabetes and diabetes care. *Res Clin Pract*. 2001; 54(Suppl 1):S13–8.
5. Rodríguez G, Iraizoz A, Barrios MA, Rivera A, Concepción-Rosabal B, Torres JC. Pharmacological action of modified natural Clinoptilolite. En: *Zeolite'97. Occurrence, properties, and utilization of natural Zeolitas*. Naples; Ischia; 1997. pp. 258-60.
6. Perdomo López I, Cruz Verde A, Iraizoz Colarte A, Barrios Alvarez A M, Rodríguez Fuentes G, García Pulpeiro O, et.al. Ungüento ZZ, Antiséptico elaborado con una zeolita natural modificada. *Rev. cuba. farm*. 1998; 32(3):169–73.
7. Rodríguez-Fuentes G, Denis AR, Barrios Álvarez MA, Colarte AI. Antacid drug based on purified natural clinoptilolite. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2006 sep 8; 94(1–3):200–7.
8. Rodríguez-Fuentes G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedré B. Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites*. 1997; 19(5–6):441–8.
9. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Norma Cubana NC 625.ZEOLITAS NATURALES — REQUISITOS. Anexo A. Requisitos de la Zeolita Natural para la salud y nutrición humana y animal. Ciudad Habana :MINSAP;2008
10. Concepción Rosabal B, Rodríguez Fuentes G, Simón R, Fleitas AS. Desarrollo del producto activo zeolítico FZ. Adsorbente específico de glucosa. *Rev. Cubana Física* 1994; 14: 67-71.

11. Concepción-Rosabal B, Rodríguez G, Balmaseda J. Characterization of Fe²⁺ containing natural clinoptilolite and its interaction with saccharides. *Microporous and Mesoporous Materials* 2000; 38(2, 3):161-166.
12. Rodríguez G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedré B. Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites* 1997 ;19: 441-448.
13. Directiva 70/524/Comunidad Europea del Consejo, sobre los aditivos en la alimentación animal. Lista de los aditivos autorizados en los piensos, publicada conforme a lo dispuesto en la letra b) del artículo 9, 2003.
14. Pond WG. En: Ming DW, Mumpton FA, editors. *Natural Zeolite'93: Occurrence, Properties, Use*, International Committee on Natural Zeolites, Brockport, NY; 1995. p. 449-57.
15. Rodríguez-Fuentes G, Meñorval de LC, Reguera E, Chavez Rivas F. Solid state multinuclear NMR study of iron species in natural and modified clinoptilolite from Tasajera deposit (Cuba). *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008; 111:577–90
16. Pyörala K. Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two populations studies in Finland *Diabetes Care*. 1979; 2(2):131–41.
17. Blonde L. Current antihyperglycemic treatment strategies for patients with type2 diabetes mellitus. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2009; 76(Suppl_5):S4–S11.
18. Pavelic K, Subotic B, Colic M. Zeolites and mesoporous materials at the dawn of the 21st Century. En: Galarneau A, Di Renzo F, Fagula F, Vedrine J, editores. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Amsterdam: Elsevier Science; 2001. p. 32.
19. Gianneto G, Montes A, Rodríguez G. Características, propiedades y aplicaciones industriales. Caracas: Ediciones Innovación Tecnológica; 2000. p. 95-8.
20. Breck DW. *Zeolite molecular sieves: Structure, chemistry, and use*. New York: John Wiley and Sons; 1974. p. 168-76.
21. Ming DW, Mumpton FA. *Minerals in soil environments*. Soil Science Society of America. Book Series. 2nd. edition. Wisconsin: Dixon JB; Weed SB; 1989. p. 873-911.
22. Domingo C, García-Carmona J, Llibre J, Rodríguez-Clemente R. Organic-Guest/Microporous-Host Composite Materials Obtained by Diffusion from a Supercritical Solution. *Advanced Materials*. 1998; 10(9):672–6.

23. González E.M, Reyes L.A, Cruz F, Pupo R y Méndez D. Informe sobre la búsqueda detallada de zeolitas en el yacimiento Piojillos-Tasajeras y exploración del sector experimental. Parte I En: Rodríguez G. y González JA. Editores. Memorias 3ra Conf. Int. Zeolitas Naturales. Centro Convenciones, La Habana, Santa Clara: Empresa Geológica; 1991.p.49-52.
24. Rivera A, Farias T, Ruiz-Salvador AR, de Ménorval LC. Preliminary characterization of drug support systems based on natural clinoptilolite. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2003 Jul 18; 61(1–3):249–59.
25. Rodríguez G, de Menorval L.C, Reguera E, Chávez F. Solid state multinuclear NMR study of iron species in natural and modified clinoptilolite from Tasajera deposit (Cuba). *Microporous and Mesoporous Materials* 2008; 111: 577–590.
26. Rivera A, Rodríguez-Fuentes G, Altshuler E. Time evolution of a natural clinoptilolite in aqueous medium: conductivity and pH experiments. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2000; 40(1–3):173–9.
27. Mumpton F.A. Clinoptilolite Redefined. *American Mineralogist* 1960; 45: 351-369.
28. Bisch D.L, En: Thermal Behavior of natural zeolites, *Natural Zeolites'93: Occurrence, Properties, Uses*, Ming and Mumpton Editors, ICNZ; 1995; pp. 259-269.
29. Zaldívar V, Margolles E, Muñoz M C. Utilización de las zeolitas naturales cubanas en la producción de monogástricos. Aspectos-metabólicos y de salud 1995. En: Registro Medicamentos No. 0823. La Habana, Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria; 2002
30. Krešimir P, Hadžija M, Bedrica L, Paveliæ J, Đikiæ I, Maša K, et al. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *J Mol Med [serie en Internet]* 2001; [citado 16 jul 2008] 78(12): Disponible en: <http://hinari.gw.who.int/whalecom/www.springerlink.com/whalecom0/content/80a18bhegl dhnejl/f ulltext.pdf>.
31. Hotta M, Nakajima H,, Yamamoto K, Aono M. Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite... *J Oral Rehabil*.1998; 25(7):485–9.
32. Galindo J, Elías A, Piedra R. Efecto de la zeolita en el predominio de grupos fisiológicos y especies de bacterias ruminales en dietas de ensilaje. En: Rodríguez Fuentes

- G, González JA, editors. Zeolitas'91. Memorias de la 3ra. Conferencia Internacional sobre "Ocurrencia, propiedades y usos de las zeolitas naturales". La Habana; 1991 pp. 275-9.
33. Álvarez A, González M, Llanio R, Cuevas M. Efecto de la zeolita sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas. En: Rodríguez Fuentes G, González JA, editors. Zeolitas'91: Memorias de la 3ra. Conferencia Internacional sobre "Ocurrencia, propiedades y usos de las zeolitas naturales» International Conference Center. La Habana; 1991. pp. 280-3.
34. González T, Rodríguez A, Delgado M). Actividad proteolítica gástrica en ratas que ingirieron zeolita natural con la dieta. Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos. La Habana. 1991). En: (Registro Medicamentos No. 0823, 1995.)
35. Tillán J, Bueno V, Simón R, Iturria J, Cabrera Y, Ortiz M. Toxicidad subcrónica de la zeolita. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. La Habana. 1991). En: (Registro Medicamentos No. 0823, 1995.)
36. Registro Medicamentos No. 0823, 1995 La Habana, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
37. Fleitas AS, Simón R. Influencia de la colestina sobre los niveles séricos de colesterol en perros Beagles. Rev Cubana Invest Bioméd. 1995; 14(2):116-20.
38. Simón R, Fleitas AS, Álvarez JA, Rodriguez G. Hypocholesterolemic action of Cholestine in cholesterol fed animals. En: Zeolite'97: Occurrence, properties and utilization of natural Zeolitas. Naples, Frede; 1997. p. 106–8.
39. Rodríguez G, Barrios MA, Iraizoz A. ZZ microbiciida de espectro amplio. Memorias de la 1ra. Jornada Ciencia y Técnica del QUIMEFA. [CD ROM] Rolando Gil, editor. Génesis Multimedia; 2004. ISBN 959-7124-60-2.
40. Rodriguez G. Characterization of ZZ a Zn²⁺ CLINOPTILOLITE, Studies in Surface Science and Catalysis. 2004; 154: 3052-3058.
41. Rodríguez G, Barrios MA, Iraizoz A. ZZ microbiciida de espectro amplio. Memorias de la 1ra. Jornada Ciencia y Técnica del QUIMEFA. [CD ROM]Rolando Gil, editor. Génesis Multimedia; 2004. IS BN 959-7124-60-2.

42. Torres A, Rodríguez G, de Menorval LC, León OS. Effects of natural zeolite modified with zinc (ZZ) in diabetes. Book of extended abstract 16th International Zeolite Conference. Zeolite'2010. Sorrento. Italia; 2010.
43. Díaz C, Concepción Rosabal B, Rodríguez G, Simón R. Selectividad en la adsorción de glucosa por la clinoptilolita modificada FZ. Revista CNIC. 1995; 26:25-7.
44. Concepción Rosabal B, Rodriguez G, Simón R. Development and featuring of the zeolitic active FZ: A glucose adsorbent. Zeolite'97. Naples, Frede; 1997.pp. 47-50.
45. Concepción B, Balmaseda J, Rodríguez G. Glucose adsorption on Fe II containing clinoptilolite; Abstracts 5th International Conference on Natural Zeolites, Napoli, 1997. p. 114-116.
46. Rodríguez G, de Ménorval LC, Reguera E, Chávez F. Characterization of ironexchanged forms of a modified clinoptilolite. A solid state multinuclear NMR study. En: Misaelides P, editor. Proceedings of Zeolite'02: 6th International Conference Occurrence, Properties and Utilization of Natural Zeolites.Thessaloniki: Greece; 2002. p. 309-314.
47. DCCT Research group N Engl J Med 1997; 46:271.
48. DCCT/EDIC. Research group N Engl J Med 2000; 342:381.
49. Zhang X, Gregg EW, Williamson DF, Barker LE, Thomas W, Bullard KM, et al.A1C Level and Future Risk of Diabetes: A Systematic Review. Dia Care. 2010; 33(7):1665–73.
50. Group UKPDS. U.K. Prospective Diabetes Study 16: Overview of 6 Years'Therapy of Type II Diabetes: A Progressive Disease. Diabetes. 1995; 44(11):1249–58.
51. Fowler MJ. Diabetes Treatment: Oral Agents. Clin Diabetes. 2010 ene 7; 28(3):132–6.
52. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al.Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement ofthe American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetes Care. 2009; 32(1):193–203.

53. Chu NV, Kong APS, Kim DD, Armstrong D, Baxi S, Deutsch R, et al. Differential Effects of Metformin and Troglitazone on Cardiovascular Risk Factors in Patients With Type 2 Diabetes. *Dia Care*. 2002; 25(3):542–9.
54. Choi D, Kim SK, Choi SH, Ko YG, Ahn CW, , Jang Y, et.al. Preventative Effects of Rosiglitazone on Restenosis After Coronary Stent Implantation in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(11):2654–60.
55. Schernthaner G,, Matthews DR,, Charbonnel B, Hanefeld M, Brunetti P, Quartet [corrected] Study Group. Efficacy and safety of pioglitazone versus metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind, randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(12):6068–76.
56. Chiasson JL, Josse RG, Hunt JA,, Palmason C,, Rodger NW, Ross SA,et.al. The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial. *Ann Intern Med*. 1994; 121(12):928–35.
57. Zhang X, Gregg EW, , Williamson DF, Barker LE, Thomas W T, Bullard KM. A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*.2010; 33(7):1665–73.
58. Aoki K, Muraoka T, Ito Y, Togashi Y, Terauchi Y. Comparison of adversegastrointestinal effects of acarbose and miglitol in healthy men: a crossover study. *Intern. Med*. 2010; 49(12):1085-1087.
59. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M,, Karasik A, Laakso M. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA*. 2003; 290(4):486–94.
60. Hanefeld M, Chiasson JL, Koehler C, Henkel E, Schaper F, Temelkova-Kurktschiev T. Acarbose slows progression of intima-media thickness of the carotid arteries insubjects with impaired glucose tolerance. *Stroke*. 2004; 35(5):1073–8.
61. Hillebrand I. Pharmacological modification of digestion and absorption. *Diabet Med*. 1987; 4(2):147–50.
62. Sachse G. Acarbose in non-insulin-dependen diabetes. In Creutzfeld W. En: *Acarbose for the treatment of diabetes mellitus*. Berlin. Springer Verlag; 1998.p.92-101.

63. Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, Bray GA. Multicenter, placebo-controlled trial comparing acarbose (BAY g 5421) with placebo, tolbutamide, and tolbutamide plus-acarbose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med.*1995; 98(5): 443–51.
64. Meneilly GS, Ryan EA, Radziuk J, Lau DC, Yale JF, Morais J, et al. Effect of acarbose on insulin sensitivity in elderly patients with diabetes. *Diabetes Care.*2000; 23(8):1162–7.
65. Hasche H, Mertes G, Bruns C, Englert R, Genthner P, Heim D, et al. Effects of Acarbose treatment in type 2 diabetic patients under dietary training: a multicentre, double-blind, placebo-controlled, 2-year study. *Diabetes Nutr Metab* 1999; 12:277-85.
66. Calle-Pascual A, Garcia-Honduvilla J, Martin-Alvarez PJ, Calle JR, Maranes JP. Influence of 16-week monotherapy with acarbose on cardiovascular risk factors in obese subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a controlled, double-blind comparison study with placebo. [*Diabetes Metab.* 1996; 22(3):201–2.
67. López-Alvarenga JC, Aguilar-Salinas CA, Velasco-Perez ML, Arita-Melzer O, Guillen LE, Wong B, et al. Acarbose vs. bedtime NPH insulin in the treatment of secondary failures to sulphonylurea-metformin therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 1999; 1(1):29–35.
68. Spengler M. Novedades en Diabetes: Los inhibidores de las alfa-glucosidasas. 3^{er} Simposio Internacional sobre Acarbosa. Munich; 1991. p. 280-284.
69. Niki I. Regulation of insulin release: analysis of the insulin secretory cascade and possible contribution to novel anti-diabetic drug development. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2000; 115(6):329-35.
70. Thomas MS, Wolever H. Assessing the Antihyperglycemic effect of Acarbose. *Diabetes Care* 1998; 21(4):667-8.
71. Tanton J. La Acarbosa: potencial terapéutico en la inhibición de las alfa-glucosidasas del intestino delgado. *Med et Hyg* 1989; 47:2493-2501.
72. Puls W, Bischoff H, Schutt H. Farmacología de los inhibidores de la amilasa y las glucosidasas. En: *Delaying absorption as a therapeutic. principles in metabolic diseases.* Georg Thieme Verlag; 1983. p. 70-8.
73. Spengler M, Schmitz H, Landen H. Evaluation of the efficacy and tolerability of Acarbose in patients with Diabetes Mellitus. *Clin Drug Invest* 2005; 25(10): 651 659.

74. Andrade RJ, et al. Acarbose-associated hepatotoxicity. *Diabetes Care*. 1998; 21(11):2029-30.
75. Haffner SM. The importance of hyperglycemia in the nonfasting state to the development of cardiovascular disease. *Endocr Rev* 1998; 19(5):583-92.
76. Chiasson JL, et al. The STOP-NIDDM Trial: An international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance: rationale, design, and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21(10):1720-1725.
77. Baron AD. Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998;40 Supl 1:51-55.
78. Holman RR. Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 40:21-25.
79. Rabasa-Lhoret R, et al. Potential of alpha-glucosidase inhibitors in elderly patients with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Drugs Aging* 1998; 13(2):131-43.
80. Hanefeld M. The role of Acarbose in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 1998; 12(4):228-37.
81. Lasserson DS, Glasziou P, Perera R, Holman RR, Farmer AJ. Optimal insulin regimens in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses. *Diabetologia*. 2009;52:1990-2000.
82. Goke B, et al. The evolving role of alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Metab Rev* 1998;14 Supl 1:31-8.
83. Scheen AJ. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes Metab* 1998;24(4):311-20.
84. Amori RE, Lau J, Pittas AG. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes. *JAMA*. 2007; 298:298-302
85. DeWitt DE, Hirsch IB. Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. *JAMA* 2003;289:2254-64.

86. Bloomgarden ZT. Insulin treatment and type 1 diabetes topics. Diabetes Care.2006;29:936-44. serie en Internet , disponible en: <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2006/NEW01304.html>. Citado el 28 de mayo 2006.
87. Franch J, Goday A, Mata M, et al. COMBO Actualización 2004. Criterios y pautas de terapia combinada en la diabetes tipo 2. Avances en Diabetología 2004;20:77-11
88. OECD Guidelines for Testing of Chemical. In vivo Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test-chromosomal Analysis Organization for Economic Co-operation and Development. OCDE, Vol. 1 and2, Paris 1993
89. Internacional Conference on Harmonization. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Test for Pharmaceutical. Federal Register: April 24, 1996 (vol. 61 Number 80) FDA, USA
90. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
91. Rodrigo M E, Valdivieso R, Suárez S, Oriondo R, Oré R. Disminución del daño oxidativo y efecto hipoglicemiante de la maca (*Lepidium meyenii* Walp) en ratas con diabetes inducida por streptozotocina An Fac med. 2011;72(1):7-11
92. Nakhaee A, Bokaeian M, Saravani M, Farhangi A, Akbarzadeh A. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalytus globules*. Indian J Clin Biochem. 2009; 24 (4): 419-25.
93. León A C., Blanco D. Peña A. , Ronda M. González B., Arteaga M. E., Bada A M. González Y. Mancebo A. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD REDVET Rev. electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> 2011 Volumen 12 N° 11
94. Alemán C. L., Mas R M. Rodeiro I, Noa M, Hernandez C, Menlmdezand. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. Laboratory Animals 1998; 32: 457-466.

95. Balkaya, M., Voyvoda, H., Ünsal, C., Çeler, H. (). Some hematological and biochemical characteristics of male and female Sprague-Dawley rats. [Internet]2001. [Citado el 13 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2001-1/Makale-5.pdf>.
96. Roe F.J. Influence of animal species, strain, age, hormonal and nutritional status. In: Experimental toxicology, the Basic issues, 2nd edn. pp. 28.
97. Prakasan A, Sethuathy S. Influence of *Casearia esculenta* root extract on protein metabolism and marker enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. Pol. J. Pharmacol., 2004, 56, 587–593.
98. Andrade C *et al.* Hypoglycemic Effect of *Cecropia Peltata*. On N5-STZ TYPE 2 Diabetic rats. Pharmacologyonline2007; 3: 203-210
99. Andrade C, Revilla C, Helmut W. Hypoglycemic effect of *Tournefortia hirsutissima* L., on *n*-streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 2007; 112: 96–100
100. Abesundara K.J, Matsui, T., Matsumoto K. Alfa-glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to therapeutic drug acarbose. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004; 52: 2541– 2545.
101. Tancrede G. Rouseau- Mignerón S.. Long term changes in diabetic states induced states induced by different doses of streptozotocin in rats. Br. J. exp. Path 1983 ;64:117-123
102. Mordes JP, Rossini AA. Modelo de diabetes experimental en ratas. Am J Med 1981;70:353-60
103. Andrade-Cetto A., Martínez-Zurita E, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol.2005; 100(3):319–22.
104. Matsui T, Yoshimoto C, K O, Oki T, Osajima Y. In vitro survey of alpha glucosida... 1996] - PubMed - NCBI. Biosci Biotechnol Biochem. 60(12): 2019-22.

105. Onal S, Timur S, Okutucu B, Zihnioğlu F. al S, Timur S, Okutucu B, Zihnioğlu F. Inhibition of α glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Prep Biochem Biotechnol.* 2005; 35(1):29-36.
106. Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R Alfa glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2008 Feb 28; 116(1):27-32.
107. Kirkland D J. Genetic Toxicology Testing Requirements: Official and Unoficial Views From Europe. *Environ Mol Mutagen.* 1993; 21(1):8-14.
108. Ministerio de Salud Pública. Buenas prácticas de laboratorio y garantía decalidad en ensayos toxicológicos. Cuba. Resolución 152. 17 de septiembre ;1992.
109. Meiattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P. The Hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. *Clin Chem.* 1978 Dec; 24(12):2161-5.
110. Naito H K. Kaplan A et al. HDL Cholesterol. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton;* 1984.p.1207-1213.
111. Amber LS. Zilversmit D B. Determination of cholesterol and triglycerides in rat plasma. *J. Lipid Res.* 1960 1 :(2) 190-191.
112. Biggs R. Human blood coagulation, haemostasis and thrombosis. 2 Ed. Oxford: Blackweel Scientific; 1976.p. 32-41.
113. Proctor RR, Rappaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin, a simplescreening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol.* 1961 Sep; 36:212-9.Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
114. Quick AJ. Fisiología y patología de la hemostasia. Buenos Aires: Ed. El Ateneo; 1957.p.59-70.
115. Trinder, P. Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxigen acceptor. *Ann Clin Biochem* y 1969; 6 (1): 24-27.
116. Kuwana, T, Rosalki S.B. Intestinal origin alkaline phosphatase activity in

- plasma for differential diagnosis of jaundice. *J Clin Pathol* 1991; 44(10):817-819.
117. Thomas L, Creatinine. *Clinical Laboratory Diagnostics. Use and assessment of Clinical Laboratory Results*. First Edition, p. 366 Germany, Editorial: TH-Books. Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main; 1998.
 118. Schedele E, Mischke V, Roll R. A. National Validation of the acute toxicologic method an alternative to the LD₅₀ test. *Arch Toxicol*. 1992; 66(7):455-70.
 119. Comisión de las Comunidades Europeas: Normas sobre medicamentos de la comunidad europea. *Medicamentos Vet Bol. Bruselas V: Editorial SECA-CEE CEE A*; 2002.
 120. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *PNAS*. 1975 ene 11; 72(11):4425-9.
 121. Brusik, D. *Principles of Genetic Toxicology*. New York: Ed. Raven Press Ltd; 1980.
 122. Scheen AJ. Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes Metab* 1998; 24(4):311-20.
 123. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathophysiology of prediabetes. *Curr Diab Rep*. 2009 Jun; 9(3):193-9.
 124. Nattrass M, Bailey CJ. New agents for Type 2 diabetes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13(2): 309-29.
 125. Tack CJ, Smits P. New drugs for diabetes. *Neth J Med* 1999; 55(5):209 - 11.
 126. Jenkins DJ, Leeds AR: Un absorbible carbohydrates and diabetes: decreased postprandial hyperglycemia. *Lancet* 1976; 8: 1225-7.
 127. Tirone TA, Brunicardi FC. Overview of Glucose Regulation. *World J Surg*. 2001 Apr; 25(4):461-7.
 128. Templeton W. *Química orgánica*. Madrid: Ed. Parafino SA; 1983.
 129. Merchán F, Gra-Ríos G y Martínez M. *Química biorgánica I*. La Habana: Ed. MES; 1986.
 130. Lehninger A. *Bioquímica*, 2ª ed. La Habana: Edición. Revolucionarias; 1979, pp. 257 -280.

131. Calle Pascual A. L., Charro Salgado A. L.. Acarbosa y diabetes mellitus:Implicaciones prácticas. An. Med. Interna. 2001; 18(5): 5-9.
132. Abdul-Ghani MA, Stern MP, Lyssenko V, Tuomi T, Groop L, DeFronzo RA. Minimal Contribution of Fasting Hyperglycemia to the Incidence of Type 2 Diabetes in Subjects With Normal 2-h Plasma Glucosa. Diabetes Care 2010; 33(3):557-61.
133. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.Nature. 2001 Dec 13; 414(6865):813-20.
134. Goodman A, Goodman L, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapia. . La Habana: Edición. Revolucionarias.; 1982. p. 833-40.
135. Houssay B, Caldeyro R, Covian MR, Fasciolo JC, Foglia VG, AB, et al.Digestión en el intestino delgado. En: Fisiología humana. La Habana, Editorial Ciencia y Técnica; 1971: 466-86.
136. Harper H. Absorción de los hidratos de carbono. Tratado de Bioquímica; La Habana: Edición. Revolucionarias.; 1993. 145-148

GLOSARIO.

DM. Diabetes Mellitus.

DMNID. Diabetes Mellitus no insulino dependiente. DM Tipo II, Diabetes del adulto.

DMID. Diabetes Mellitus insulino dependiente. DM Tipo I, Diabetes Juvenil.

(FZ). Fe^{+2} clinoptilolita

ΔA . Delta área.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

LDL. Lipoproteína de baja densidad.

HDL. Lipoproteína de alta densidad.

TG. Triglicéridos.

TPTK. Tiempo de tromboplastina parcial activada con Kaolin.

TP. Tiempo de protombina.

NZ. Clinoptilolita natural purificada.

CZ. Zeolita Natural intercambiada con Calcio. También conocida como Colestina.

ZZ. Zeolita Natural intercambiada con Zinc.

MINSAP. Ministerio de Salud Pública.

IMRE. Instituto de Materiales y Reactivos. Ciencia y tecnología de Materiales.

IFAL. Instituto de Farmacia y Alimentos.

CENPALAB. Centro Nacional para Animales de Laboratorio.
INACV. Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular.
ANOVA: Análisis de varianza.
CECMED. Centro Estatal de Control de Medicamentos.
Dosis efectiva 50 (DE₅₀). Dosis efectiva media.
(DE₅₀), definida como la dosis de cada droga necesaria para producir el 50 % del efecto esperado.
DS. Desviación Standard.
AE. Actividad específica.
ns. No significativo.
ADA. Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association)
ALA. Asociación Latinoamericana de Diabetes.
FID. Federación Internacional de Diabetes
SU. Sulfonilureas.
OCDE. Organisation for Economic Co-Operation and Development. OCDE, Paris 1993.
FDA. Food and Drug Administration.
CC. Cationes de compensación.
Hb1C. Hemoglobina Glicosilada.
USP. United Estate Pharmacopia.
U. Unidades de Insulina.
CNSN. Centro Nacional de Seguridad Nuclear.
NRIB. Normas Ramales de la Industria Básica.
Bq. Bequerel

Publicaciones que contienen los resultados que se presentan en la tesis.

Artículos publicados por el autor principal.

1- Modelo experimental de diabetes en conejos. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo, Gisela Almeida, Ana Maria Quintela, Maria Antonia Alfonso. Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascular 2000; 1(1):10- 4

- 2- Síndrome X alto riesgo de enfermedad arterial. Andrés S. Fleitas Estévez. Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascul ar 2002; 3(1):68-74
 - 3- Efecto del Glicolit sobre la absorción de glucosa proveniente de una fuente de sacarosa. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo, Milagros Derivet. Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascul ar 2001, vol 15
 - 4- Efecto del Glicolit sobre la absorción de glucosa marcada con C14 en ratas Wistar. Andrés S. Fleitas, Milagros Derivet, Rafael Simón Carballo. Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascul ar 2001 Vol1.
 - 5- Efecto de diferentes dosis de Glicolit en ratas Wistar. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo. Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascul ar 2004; 5(1)
Disponib le en URL : http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol5_1_04/ang08104
 - 6- Acción hipocolesterolémica de la Colestina en conejos normocolesterolémicos. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo. Rev invest. Biomédicas Vol 14. (2) 1995.
 - 7- Actividad de los receptores hepáticos en conejos tratados con colestina. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo. Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascul ar 2004; 5(1)
 - 8- Efecto del Glicolit sobre la cinética de absorción de glucosa marcada con 14 C en ratas. Andrés S. Fleitas, M. Derivet. Rev.CENIC. Número especial 2005. Vol 36
 - 9- Un nuevo producto de origen natural para disminuir los niveles de colesterol en sangre. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo.1/93. Resumed 6 (1): Enero - Junio 1993.
 - 10- Influencia de la colestina sobre los niveles séricos de colesterol en perros beagle. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo. Rev Invest. Biomédicas 1995;14(2): 116-120
 - 11- Efecto de la Colestina sobre la progresión experimental de la aterosclerosis en conejos. Andrés S. Fleitas, Rafael Simón Carballo.Rev. Cubana de Angiología y Cirugía Vascul ar 2002; vol 3 (2):18-23.
- Otras publicaciones sobre el tema en que el autor participa.
- 12- Desarrollo del producto activo zeolítico FZ. Adsorbente específico de glucosa, Concepción-Rosabal, B., Rodríguez Fuentes, G., Simón, R., Fleitas, A. y Mora, E *Revista Cubana de Física (1994)*
 - 13- Efecto del GLICOLIT sobre la adsorción de la glucosa en ratas. Simón, R., Tillán, J., Fleitas, A., Concepción-Rosabal, B. y Rodríguez Fuentes, G.; *Revista CNIC Vol. 26 (1995)*

- 14- Estudio del sistema zeolítico FZ con propiedades biocatalíticas. Concepción-Rosabal, B., Simón, R., Fleitas, A., Díaz, C. y Rodríguez-Fuentes, G.; *Actas XV Simp. Iberoam. Catálisis, Córdoba (1996) 1577.*
- 15- GLUCOLITE, FZ. Solicitud Registro de Marca No.2002.
- 16- Estudio del sistema zeolítico FZ con propiedades biocatalíticas. Concepción-Rosabal, B., Simón, R., Fleitas, A., Díaz, C. y Rodríguez-Fuentes, G.; *Actas XV Simp. Iberoam. Catálisis, Córdoba (1996) 1577.*
- 17- Study of the reaction of a Ca-clinoptilolite and human bile, R. Simón Carballo, G. Rodríguez-Fuentes, C. Urbina, A. Fleitas, *Zeolites and Mesomorphous Materials, Stud. Surf. Sci. and Catalysis 135*, A. Galarneau et al. Eds, Elsevier Science B.V., ISBN: 0 444 50238 6 y ISSN: 0167 2991, (2001) 32-O-03
- 18- Comparación del efecto de FZ con un fármaco de mecaismo de accion similar, la Acarbosa en perros beagles. Andrés S. Fleitas. *Revista española de investigaciones quirúrgicas Vol XIII, número 2 (53-57) 2010*
- 19- Efecto del preparado FZ sobre algunos parámetros de la coagulación en perros Beagles. Andrés S. Fleitas. *Revista española de investigaciones quirúrgicas Vol XIII, número 2 (109-111) 2010*
- 20- Efecto de FZ sobre el control glucémico en ratas diabéticas. Andrés S. Fleitas. *Revista española de investigaciones quirúrgicas. Spanish journal of surgical research Vol. XIV n 4.(213-217) 2011*
- 21- Zeolitas naturales de utilidad en la práctica médica. Andrés S. Fleitas. *Rev. Cub. de Angiología y Cir. Vasc.Vol 12 (2): 2011*
- 22- Genotoxicidad de Fe⁺² -Clinoptilolita (FZ). *Spanish journal of surgical research Vol XV nº:4 (197-202) 2012*

Proyectos que sustentan el trabajo.

- Proyecto No.58. *Desarrollo de los principios activos zeolíticos y sus formas terminadas.* Programa Ramal MINSAP “Programa Nacional de Medicamentos”

- Proyecto. *Farmacología Preclínica del Glicolit*. Programa Ramal MINSAP “Programa Nacional de Medicamentos”
- Caractérisation et développement de zéolithes naturelles comme support de médicaments (1999-2001). Proyecto Bilaterales CNRS-MINVEC
- Caractérisation et développement de zéolithes naturelles comme support de médicaments, d'absorbants et de catalyseurs (2002-2004). Proyectos Bilaterales CNRS-MINVEC.

Trabajos presentados en eventos por el autor.

- 1-“Modelos animales empleados en el estudio de las enfermedades” Primer Congreso regional de transferencia de tecnología. Palacio de las Convenciones 19-23 de noviembre 2001.
- 2- Efecto de la Colestina sobre la progresión de la aterosclerosis experimental en conejos. Congreso Internacional, SOLAT. Hotel Habana Libre Octubre 1-4 2001, La Habana.
- 3- Efecto de un antihiper glucemiante (Glicolit) sobre la absorción de glucosa marcada con C14 en ratas Wistar.
Congreso Internacional de Aterosclerosis FRATEROS en la comunidad SILAT 25-28 de nov 2002
- 4- Empleo de modelos experimentales en la diabetes y la aterosclerosis por la introducción de modificaciones en la dieta.
XVII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Nov. 2002.
- 5- Los antihiper glucemiantes en el control glucémico del paciente diabético.
Angiocaribe 2002. Jornada de Temas Terminados. INACV:21-25 de Octubre 2002.
- 6-. Efecto protector del Glicolit sobre la coagulación en perros Beagle.XV Forum de Ciencia y Técnica INACV 4 de Julio 2003.
- 7- Estudio Farmacológico de un Antihiper glicemiante Natural. El Glicolit.
I Jornada de la Sociedad Cubana de Medicina Bioenergética y Naturalismo y III jornada de Medicina Tradicional China. 26 de Junio 2003.
- 8- Farmacología Preclínica del Glicolit. 23 de marzo 2005. Jornada de Temas Terminados INACV.

9-Desarrollo de un antihiperglicemiante de Origen Natural. El Glicolit. Plantas medicinales 2005 Cienfuegos.

10-Desarrollo de un Antihiperglicemiante, el Glicolit.

Facultad de Ciencias Médicas. "Dr. Salvador Allende". Jornada Científica Integrada.6 de Junio 2005.

11-Efecto del FZ sobre la cinética de absorción de glucosa marcada en ratas.

XIV Congreso Internacional CENIC. Palacio de las Convenciones junio2005.

12-Desarrollo de un producto natural con acción antihiperglicemiante.V Congreso Continental de Productos y Medicina Natural Palacio de las Convenciones Nov. 2005.

13-Effect of FZ (Glicolit) on kinetic of absorption of labeled 14 glucose in Wistar rats.

FAPRONATURA 2006, Varadero.

14-Development of a natural substance as an antihiperglicemiant drug for glicemic control in diabetic patients.

FAPRONATURA 2006, Varadero.

15-Desarrollo de un producto natural como fármaco antihiperplucemiante para el control glucémico del paciente diabético.

I congreso del Capítulo Latino Americano de la Sociedad Internacional de Especialistas Vasculares. Palacio de las Convenciones Abril 2007.

16-Efecto del FZ sobre la cinética de absorción de glucosa marcada en ratas.

I Congreso del Capítulo Latino Americano de la Sociedad Internacional de Especialistas Vasculares. Palacio de las Convenciones Abril 2007.