



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

TESIS:

**“EFECTOS ANTIOXIDANTES DE LAS NANOPARTÍCULAS
DE PLATA DE SÍNTESIS VERDE SOBRE EL CEREBRO DE
RATAS CON DIABETES EXPERIMENTAL”**

QUE PRESENTA EL

Q.F.B. JENARO LEMUS DE LA CRUZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DIRECTOR DE TESIS

D.C. FRANCISCO ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-DIRECTOR DE TESIS

D.C. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO

Morelia, Michoacán, Noviembre de 2021



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi esposa Sandra, a mis padres Marcelino y Sandra, mis abuelos Genaro y Antonía y mis hermanos Antonio, Marcelino y Guadalupe, que siempre me han apoyado incondicionalmente y han formado parte de este proceso, y que gracias a su apoyo he podido cumplir una meta más, y recordarles que siempre estaré agradecidos con ustedes y son lo más importante en mi vida.

*"En la vida no existe nada que temer, sólo cosas que comprender".
Marie Curie*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi esposa por todo su amor y por siempre ser parte de mis proyectos, de mis metas y mis sueños, gracias por siempre estar a mi lado.

A mis papás, abuelos y hermanos, que siempre me apoyan y que me brindaron la oportunidad de cumplir mis metas desde pequeño. Los quiero mucho.

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de maestría y por el apoyo académico que me brindó durante la realización del mismo.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica: Donovan, Mitchell, Cinthia, Maribel, Marina y Oscar.

A mi Coasesor Dr. Gerardo Rosas Trejo y los miembros del comité tutorial: Dra. Rocío Montoya Pérez, Dr. Christian Cortés Rojo y Dr. Homero Reyes de la Cruz por sus aportaciones a este trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y en especial al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas y al Laboratorio de Bioquímica.

Al Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Materiales, y en especial al Laboratorio de Molienda mecánica y Termo-gravimetría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas	V
Lista de abreviaturas	VI
Resumen	X
Abstract	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición y estadísticas	1
1.2 Clasificación de la DM	1
1.2.1 DM tipo 1	1
1.2.2 DM tipo 2	2
1.2.3 Diabetes gestacional	4
1.2.4 Otros tipos específicos de DM	5
1.3 Diagnóstico de la DM	5
1.4 Complicaciones de la DM	5
1.4.1 Complicaciones agudas de la DM	5
1.4.2 Complicaciones crónicas de la DM	6
1.5 Implicaciones de la DM en el cerebro	7
1.5.1 El cerebro	7
1.5.2 Metabolismo cerebral	10
1.5.2.1 Transporte de glucosa	10
1.5.2.2 Transporte de glucosa en el cerebro	11
1.5.3 Cambios metabólicos en el cerebro inducidos por la DM	11
1.5.3.1 Mitocondria	12
1.5.3.2 Ruta de los polioles	13
1.5.3.3 Productos finales de glucosilación avanzada (PFGA)	14

1.5.3.4 Vía de la hexosamina	14
1.5.3.5 Vía de PKC	14
1.6 Sistemas antioxidantes	15
1.7 Desbalance entre la producción de ER y la actividad de los sistemas antioxidantes inducida por la DM y su implicación en trastornos cerebrales	15
1.8 Tratamiento farmacológico de la DM	16
1.9 La medicina tradicional como una alternativa terapéutica contra la DM	17
1.9.1 Metabolitos secundarios	17
1.9.2 Terpenos	17
1.9.3 Compuestos que contienen nitrógeno o alcaloides	18
1.9.4 Compuestos fenólicos	18
1.9.5 Plantas medicinales usadas para tratar la DM	19
1.9.6 Investigaciones en <i>Eryngium sp</i>	21
1.9.7 <i>Eryngium carlinae</i> F. Delaroche	23
1.10 Síntesis de nanopartículas y su uso en la terapéutica moderna	24
1.10.1 Síntesis verde de nanopartículas	25
1.10.2 Nanopartículas de plata (AgNP) de síntesis verde	27
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos específicos	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Materiales	29
5.1.1 Material vegetal	29
5.1.2 Animales	29
5.1.3 Protocolo experimental	29
5.2 Métodos	29
5.2.1 Preparación del extracto	29

5.2.2 Síntesis y caracterización de AgNP	30
5.2.3 Análisis fitoquímico del extracto	30
5.2.3.1 Cuantificación de fenoles totales	30
5.2.3.2 Cuantificación de flavonoides totales	30
5.2.3.3 Cuantificación de terpenoides totales	31
5.2.4 Determinación de la actividad antioxidante total	31
5.2.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH'	31
5.2.6 Inducción de diabetes	31
5.2.7 Efecto de la administración de <i>E. carlinae</i> y las AgNP's sobre los niveles de glucosa y el peso corporal	32
5.2.8 Obtención de muestras para medir los parámetros bioquímicos y la actividad antioxidante	32
5.2.9 Aislamiento de mitocondrias de cerebro	32
5.2.10 Determinación de parámetros bioquímicos	33
5.2.10.1 Determinación de glucosa sérica	33
5.2.10.2 Determinación de colesterol total	33
5.2.10.3 Determinación de triacilglicéridos	33
5.2.11 Determinación de la producción de ERO	33
5.2.12 Determinación de la peroxidación de lípidos	33
5.2.13 Determinación de la actividad de la catalasa (CAT)	34
5.2.14 Determinación de la actividad de la SODmt	34
5.2.15 Determinación de la actividad de la GPx	34
5.2.16 Determinación de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones	34
5.2.16.1 NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I)	34
5.2.16.2 Succinato:DCIP oxidorreductasa (complejo II)	35
5.2.16.3 Succinato:citocromo <i>c</i> oxidorreductasa (complejo II + III)	35
5.2.16.4 Citocromo <i>c</i> oxidasa (complejo IV)	35
5.2.17 Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS	36

6.1 Síntesis y caracterización de las AgNP	36
6.2 Evaluación fitoquímica del extracto acuoso de <i>Eringium carlinae</i>	37
6.3 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto y la combinación de extracto-nanopartículas (Ex-AgNP)	38
6.4 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre durante el periodo de tratamiento	39
6.5 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre ..	40
6.6 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)	41
6.7 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la peroxidación de lípidos en mitocondrias	42
6.8 Efecto del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la actividad de enzimas antioxidantes en cerebro	43
6.9 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) mitocondrial en cerebro	45
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIÓN	53
9. PERSPECTIVAS	53
10. REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Planta de <i>Eryngium carlinae</i>	23
Figura 2. Síntesis y caracterización de las AgNP por UV-Vis	36
Figura 3. Análisis por MEB de las AgNP sintetizadas a partir del extracto	37
Figura 4. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto y la combinación extracto-AgNP ...	38
Figura 5. Efecto de la administración del extracto y la combinación del extracto AgNP en los niveles de glucosa y peso corporal	39
Figura 6. Efecto de la administración del extracto y la combinación del extracto-AgNP en la producción de ERO	41
Figura 7. Efecto de la administración del extracto y la combinación de extracto-AgNP en la peroxidación de lípidos	42
Figura 8. Efecto de la administración del extracto y la combinación de extracto-AgNP en la actividad de enzimas antioxidantes	44
Figura 9. Efecto de la administración del extracto y la combinación de extracto-AgNP en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones	46
Figura 10. Mecanismo de acción propuesto del extracto y la combinación extracto-AgNP	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de referencia normales y anormales de glucosa	5
Tabla 2. Plantas con propiedades antidiabéticas	19
Tabla 3. Nanopartículas de síntesis verde con aplicaciones farmacológicas	26
Tabla 4. Cuantificación fitoquímica del extracto acuoso de <i>Eryngium carlinae</i>	37
Tabla 5. Efecto del extracto y la combinación de extracto-AgNP en los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre	40

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADH	Ácido docosahexaenóico
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos grasos libres
AgNP	Nanopartículas de plata
AR	Aldosa reductasa
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
BHT	Butilhidroxitolueno
CAD	Cetoacidosis diabética
CAT	Catalasa
CUPRAC	Capacidad antioxidante reductora cúprica
Cyt <i>c</i>	Citocromo <i>c</i>
DAG	Diacilglicerol
DCIP	2,6-diclorofenolindolfenol
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMID	Diabetes mellitus insulino dependiente
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilendiamina
DPP4	Dipeptidil peptidasa-4
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DRX	Difracción de rayos X
DTNB	5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
EGTA	Etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'
EHH	Estado hiperosmolar hiperglucémico

ER	Especies reactivas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EtOH	Etanol
GFAT	Glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa
GK	Glucocinasa
GOD	Glucosa oxidasa
GPO	Glicerol fosfato deshidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HDL-c	Colesterol en lipoproteínas de alta densidad
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico
HLA	Antígeno leucocitario humano
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferrocianuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
KH ₂ PO ₄	Dihidrógeno fosfato de potasio
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa
MDA	Malondialdehído
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MODY	Diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NO•	Radical óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
O ₂ • ⁻	Anión superóxido
OH•	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PARF	Poder antioxidante reductor férrico
PFGA	Productos finales de glucosilación avanzada
PIG	Polipéptido inhibidor gástrico
PKC	Proteína cinasa c
POD	Peroxidasa
PSG-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
Q•	Radical ubiquinona
QH•	Radical semiquinona
RAGE	Receptor de productos finales de glucosilación avanzada
rpm	Revoluciones por minuto
SDH	Sorbitol deshidrogenasa
SODmt	Superóxido dismutasa mitocondrial
SRI	Sustrato del receptor de insulina
STZ	Estreptozotocina
TAC	Capacidad antioxidante total
TAG	Triacilglicéridos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TRP	Tiempo de residencia promedio
TRx	Tiorredoxina
UQ	Ubiquinona

UV-Vis Ultravioleta-visible
WST-1 Disulfonato de 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico de etiología múltiple, cuya principal característica es hiperglucemia crónica, debida a la deficiencia o resistencia a la insulina, o una combinación de ambas y que conduce a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. A largo plazo, la DM produce diferentes complicaciones que afectan prácticamente todos los tejidos y órganos. Uno de los órganos más afectados por las complicaciones de la DM es el cerebro, debido a que la DM está estrechamente relacionada con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), un desbalance de los sistemas antioxidantes y la disfunción mitocondrial. Se ha reportado que el cerebro es altamente susceptible al estrés oxidativo, y con el transcurso de la enfermedad, todos los factores anteriormente mencionados juegan un papel fundamental en el desarrollo de diversas complicaciones a nivel cerebral, como desarrollo de Alzheimer, decline cognitivo, alteraciones en la neurotransmisión, neuroinflamación, apoptosis, necrosis, entre otras. Por otro lado, la medicina tradicional ha surgido como una alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la DM; una de las plantas usadas en la medicina tradicional para tratar la diabetes es *Eryngium carlinae*, la cual ya ha demostrado experimentalmente tener propiedades hipoglucémicas, antioxidantes e hipolipidémicas, que la hacen muy prometedora para ser usada como un tratamiento antidiabético. Por otro lado, en años recientes se han buscado nuevas estrategias para asegurar una rápida y eficaz administración de fármacos, una de estas estrategias es el uso de nanopartículas de síntesis verde, que combinan el uso de extractos vegetales con nanopartículas metálicas que aseguren un mayor efecto biológico. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto del extracto de *Eryngium carlinae* y su combinación con nanopartículas de plata (AgNP) en los niveles de glucosa, y la función mitocondrial. Se obtuvieron AgNP a partir del extracto acuoso de *E. carlinae*, que fueron caracterizadas por UV-Vis y microscopía electrónica de barrido (MEB). Se utilizaron 36 ratas Wistar macho sin o con DM experimental (Estreptozotocina [STZ] 45 mg/Kg de peso) y se dividieron en 6 grupos con una n=6 y fueron tratadas o no con una dosis de 30 mg/Kg de peso de extracto acuoso de *E. carlinae* o con una dosis de 30 mg/Kg de peso de la combinación extracto-AgNP durante 45 días. El grupo diabético mostró un incremento significativo de los niveles de glucosa y triglicéridos en sangre, así como de la producción de ERO y peroxidación de lípidos en mitocondrias. También, se observó una disminución en la actividad de la SODmt, GPx y los complejos I, II y III comparado con el grupo control. La administración con los tratamientos en ratas diabéticas mostraron que disminuyó la producción de ERO y la peroxidación de lípidos, también se restauró la actividad de la SODmt, GPx y de los complejos de la CTE, comparado con el grupo diabético, y únicamente el grupo tratado con la combinación de extracto-AgNP, disminuyó significativamente los niveles de glucosa y triglicéridos en sangre comparado con el grupo diabético. En conjunto, nuestros resultados sugieren, que los tratamientos, tanto con extracto acuoso de *E. carlinae*, como la combinación de extracto-AgNP pudo revertir el desbalance del sistema de defensa antioxidante y la producción de ERO, así como la disfunción mitocondrial en el cerebro, y únicamente la combinación disminuyó los niveles de glucosa y triglicéridos de ratas con DM.

Palabras clave: Diabetes mellitus, estrés oxidativo, *Eryngium carlinae*, nanopartículas de síntesis verde, combinación extracto-AgNP.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder of multiple etiology, the main characteristic is that occurs with chronic hyperglycemia, due to insulin deficiency or resistance, or a combination of both, leading to alterations in carbohydrates, lipids and proteins metabolism. With the development over several years, DM causes different complications that affect practically all tissues and organs. One of the organs most affected by the complications of DM is the brain because DM is closely related to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), an imbalance of the cellular antioxidant defense system and mitochondrial dysfunction. It has been reported that the brain is highly susceptible to oxidative stress. With the course of the disease, all the factors mentioned above play a fundamental role in developing various complications at the brain level, such as the development of Alzheimer's, cognitive decline, alterations in neurotransmission, neuroinflammation, apoptosis, and necrosis, among others.

On the other hand, traditional medicine has emerged as an alternative in the treatment of various diseases, including DM; one of the plants used in traditional medicine to treat diabetes is *Eryngium carlinae*, which has already been experimentally shown to have hypoglycemic, antioxidant and hypolipidemic properties, which makes it very promising to be used as an antidiabetic treatment. Moreover, new strategies have been sought to ensure a rapid and effective administration of drugs in recent years. One of these strategies is using green synthetic nanoparticles, which combine the use of plant extracts with metallic nanoparticles that ensure a more significant biological effect. The objective of this work was to compare the effect of the extract and its combination with silver nanoparticles (AgNP) on glucose levels and mitochondrial function. AgNP was obtained from the aqueous extract of *E. carlinae* characterized by UV-Vis and SEM. 36 male Wistar rats without or with experimental DM (STZ 45 mg/Kg of weight) were divided into 6 groups with n = 6 and were treated or not with a dose of 30 mg/Kg of weight of the aqueous extract of *E. carlinae* or with a dose of 30 mg/Kg of weight of the extract-AgNP combination for 45 days. The diabetic group showed a significant increase in glucose and triglycerides in the blood, as well as the production of ROS and lipoperoxidation in mitochondria. Also, a decrease in SODmt, GPx and complexes I, II and III activities compared to the control group. Administration with the treatments in diabetic rats showed decreased ROS production and lipoperoxidation, they also restored the activities of SODmt, GPx and CTE complexes compared to the diabetic group, and only the group treated with the extract-AgNP combination decreased significantly the blood glucose and triglyceride levels, compared to the diabetic group. Our results suggest that the treatment with both *E. carlinae* aqueous extract and the extract-AgNP combination can reverse the imbalance of the antioxidant defense system and ROS production, as well as mitochondrial dysfunction in the brain, and only with the combination (extract-AgNP) lowers glucose and triglyceride levels in rats with DM.

Key words: Diabetes mellitus, oxidative stress, *Eryngium carlinae*, green synthetic nanoparticles, extract-AgNP combination.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y estadísticas

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico de etiología múltiple que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) de manera crónica y con alteraciones del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas resultado de defectos en la secreción de insulina o de la acción de la insulina en las células, o por una combinación de ambas (IDF, 2019).

La DM es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, ya que en los últimos años ha tenido un gran incremento en el número de personas que la padecen. Se estima que la cifra de personas con DM en 2019 alcanzó los 463 millones de diabéticos y se estima que para el año 2045 la cifra se incremente hasta los 700.2 millones (IDF, 2019). México, desafortunadamente, ocupa el sexto lugar a nivel mundial con número de personas con diabetes con un total de 12.8 millones y se estima que para 2045 la cifra incremente hasta los 22.3 millones (IDF, 2019), en nuestro país. Además, la diabetes ocupa la segunda causa de muerte solo detrás de las enfermedades cardiovasculares, y no solo tiene un fuerte impacto en la salud de la población, también económicamente, la diabetes representa una fuerte carga ya que se estima que en México se gastan aproximadamente 3,872 millones de dólares anuales en tratamientos y atención médica para pacientes diabéticos. Por esta razón, es tan importante tener tratamientos efectivos para tratar la diabetes y fortalecer las medidas preventivas para evitar que la diabetes y sus complicaciones causen más problemas en la población tanto nacional como mundial.

1.2 Clasificación de la DM

1.2.1 DM tipo 1

La DM1 representa aproximadamente el 10% de todos los casos de diabetes (IDF, 2019). La DM 1 se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina, esta deficiencia se da por varias causas:

La destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, que también se denomina DM tipo 1A. La patogénesis resulta de la interacción entre factores genéticos y ambientales que alteran el sistema inmune y culminan en la destrucción de las células β pancreáticas. Se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos contra los islotes pancreáticos, con destrucción selectiva de las células β . Una variante de la DM1, es la destrucción de las células β sin clara evidencia de autoinmunidad o DM tipo 1B o idiopática, que se reserva para las formas que cursan con una carencia fluctuante de insulina sin signos de autoinmunidad contra las células β (Tébar y Escobar, 2009).

Existe una clara predisposición genética para desarrollar DM1, con un riesgo de 6% de padecerla en familiares de primer grado, frente al 0.4% de la población general. Existen cerca de 20 regiones en el genoma humano para los genes de la DM1, que se denominan DMID. De todos los loci de susceptibilidad propuestos, los de mayor riesgo son los asociados a la región HLA. El HLA es una familia de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 que permiten la identificación de las moléculas propias de las extrañas. Es en la región

HLA de clase II donde residen los principales determinantes de susceptibilidad genética para la DM1. Se han definido bioquímicamente tres haplotipos del HLA de clase II que son DR, DQ y DP, siendo los haplotipos HLA-DR Y HLA-DQ los que tienen una mayor asociación genética con la DM1 (Noble, 2015). El segundo locus de susceptibilidad a DM1 se encuentra en el gen INS-VNTR que se localiza en el promotor del gen de la insulina. Se relaciona con el factor de transcripción regulador autoinmune (AIRE) implicado en la eliminación de las células T que son autoreactivas a la expresión tímica de insulina. La alteración del gen INS-VNTR conlleva menor expresión tímica de insulina, lo que condiciona una reducción de tolerancia a la insulina. El tercer locus se encuentra en el gen CTLA-4. Su función es atenuar la respuesta inmune mediante la unión de ligandos (CD80 o CD86) que se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos. Una alteración de este gen conduce a un mayor riesgo de padecer una enfermedad autoinmune. El cuarto locus de susceptibilidad a DM1 es la PTPN22. Se expresa en las células T y codifica para una tirosin-fosfatasa linfocítica (LYP). Un polimorfismo específico de LYP determina una hiperreactividad de las células T y se relaciona con enfermedades autoinmunes (DiMeglio et al., 2018).

También, se ha relacionado la DM1 con factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles, entre los que cabe destacar a los virus (rubéola, enterovirus, citomegalovirus, virus coxsackie, parvovirus B19 y rotavirus) que pueden infectar directamente las células β y causar citólisis, o bien pueden inducir una respuesta inmune. Asimismo, se ha sugerido la implicación de ciertos alimentos (por ejemplo, la exposición temprana a la proteína de la leche de vaca o el gluten) o de toxinas ambientales (por ejemplo las nitrosaminas) en la patogénesis de la DM1, sin embargo, su papel se encuentra todavía poco dilucidado (Tébar y Escobar, 2009).

La producción de auto-anticuerpos que desencadena la autoinmunidad específica hacia las células β , implica insulinitis y su destrucción. En este proceso participan tanto la inmunidad celular como la humoral. Los principales marcadores de autoinmunidad en la DM1 y que se encuentran relacionados con la patogénesis de la enfermedad son ICA, IAA, IA2 o ICA512 y GAD65 o GADA (Tébar y Escobar, 2009). La presencia de varios anticuerpos persistentemente positivos junto con haplotipos HLA de elevado riesgo incrementa el riesgo de desarrollar DM1. El mecanismo responsable de la producción de estos autoanticuerpos es la activación del sistema inmune mediado por linfocitos T en individuos genéticamente susceptibles (DiMeglio et al., 2018). Los antígenos de las células β pancreáticas son presentados a las células T CD4+ mediante las APC. Estas APC secretan IL-12 que promueve la secreción de IFN- γ e IL-2 por parte de la célula T CD4+. Finalmente, el IFN- γ estimula a los macrófagos o a las células T CD8+ para liberar radicales libres o más citocinas. Estas células T que infiltran los islotes provocan la destrucción de células β mediante dos mecanismos: liberando moléculas citotóxicas como las citocinas IL-1, IFN- γ , TNF- α , granzima B o perforina, o bien activando las señales de apoptosis celular a través de la vía Fas (Battaglia, 2014).

1.2.2 DM tipo 2

El desarrollo de la DM2 comprende el deterioro progresivo de la función de las células β , todo ello en el contexto de resistencia a la insulina. La DM2 representa aproximadamente el 90% de todos los casos a nivel mundial (IDF, 2019).

Genéticamente, la DM2 es más frecuentemente poligénica (mayor a 90%) y es el resultado de una herencia debida a un conjunto de genes donde cada uno de ellos ejerce un efecto parcial y solo determinadas combinaciones y en presencia de determinados factores de riesgo, como la obesidad, se desarrolla la diabetes. En el desarrollo de la DM2 destacan los polimorfismos de los genes PPAR- δ , PGC1, KLF11, TCF7L2, CAP10, KCNJ11, HFN4A, TCF2, WFS1, HHEX-IDE, SLC30A8, CDKAL1, CDKN2A-2B, IGF2BP2 y FTO. Cabe mencionar que a pesar de que las relaciones son sólidas y evidentes, el riesgo conferido aisladamente a cada gen no es potente, debe haber una combinación de varios de ellos. Existen, además, otros genes que se relacionan discretamente con la resistencia a la insulina (ENPP1, RBP4, PEPCK, SRI1, INS y NNT) o con la inflamación crónica de bajo grado (TNFR, IL6R) que forman parte del mecanismo etiopatogénico de la DM2, varios componentes del síndrome metabólico y la aterosclerosis (Tébar y Escobar, 2009).

La resistencia a la insulina se refiere a la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus efectos biológicos en tejidos diana. Implica la reducción de la capacidad de la insulina para estimular la utilización de glucosa por el musculo esquelético y el tejido adiposo. Los mecanismos celulares relacionados en la resistencia a la insulina se basan en el bloqueo de la señal de la insulina. En condiciones normales, la señal de la insulina implica la unión de la insulina con su receptor, un receptor de membrana con actividad de tirosina cinasa. Esta unión provoca la activación del complejo proteína SRI. Este SRI se une a otras proteínas, y se activa una señal en cascada, que va a ocasionar una gran variedad de respuestas, una de ellas la translocación de transportadores de glucosa a la membrana plasmática para permitir el ingreso de glucosa a la célula (Galicia-Garcia et al., 2020). El bloqueo de la activación de la cascada se puede producir en varios niveles. Los AGL activan cinasas inflamatorias inhibitoras como IKK y JNK. Estas incrementan la fosforilación serina/treonina del complejo SRI, reduciendo así la cascada de activación. En personas obesas con una mayor circulación de AGL y aumento de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-6. El TNF- α incrementa la lipólisis en adipocitos, lo que implica la elevación de AGL, que tendrá efectos negativos sobre la cascada de señalización de la insulina. La IL-6 inhibe la señal de la insulina mediante el aumento de expresión de proteínas SOC, que se encargan de degradar el complejo proteína SRI (Tébar y Escobar, 2009).

La disfunción de las células β es otro mecanismo implicado en la aparición y el desarrollo de la DM2. Esta disfunción se define como una limitación en la capacidad celular para compensar la hiperglucemia. Entre los factores implicados en la pérdida progresiva de función y masa de células β se consideran: la glucotoxicidad debido a un ambiente hiperglucémico. El mecanismo está relacionado a la gran producción de ER, que dañan distintos componentes celulares y producen apoptosis de la célula β . La lipotoxicidad, que implica niveles circulantes elevados de AGL de forma persistente que influyen en la pérdida de función progresiva. Las citocinas proinflamatorias, en particular el TNF- α , la IL-6, el receptor antagonista de la IL-1 y la leptina, que se relacionan con la resistencia a la insulina,

pueden afectar el funcionamiento de las células β y están relacionadas con la activación del sistema inmune innato. Esta activación también se da por una combinación de factores ambientales como la obesidad. La activación del sistema inmune innato, a su vez, provoca autoinmunidad de bajo grado por la cual se pueden destruir las células β , pero por supuesto muy lejos de la autoinmunidad propia de la DM1. Finalmente, también se ha descrito una relación bidireccional entre el metabolismo del hierro y la DM2, de manera que un incremento en los depósitos de hierro implicaría una mayor predisposición de padecer DM2, mientras que la disminución de éstos sería predisposición protectora (Galicia-García et al., 2020).

1.2.3 Diabetes gestacional

La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como una intolerancia a los hidratos de carbono de gravedad variable, que comienza o se reconoce por primera vez durante el embarazo, lo que significa que la intolerancia a la glucosa pudo haber precedido al embarazo. La incidencia de la diabetes gestacional varía en las distintas poblaciones de los estudios y se calcula que se produce en el 3 y el 5% de las mujeres embarazadas. La probabilidad de desarrollar diabetes gestacional aumenta significativamente en ciertos subgrupos, como las mujeres con antecedentes familiares de DM2, las de mayor edad y las obesas. El crecimiento fetal excesivo y sus consecuencias son las principales preocupaciones de la diabetes gestacional. Las consecuencias del crecimiento fetal excesivo asociado a la DMG incluyen trauma de nacimiento, mortalidad materna por parto quirúrgico y el posible aumento de los riesgos de intolerancia a la glucosa y obesidad en su descendencia (IDF, 2009).

La fisiopatología de la diabetes gestacional involucra varios factores, primeramente la resistencia a la insulina y por lo tanto, un menor transporte de glucosa a los tejidos. Esta resistencia está asociada con una disminución en la fosforilación de la proteína SRI-1, debido a una menor expresión de esta misma, también por otro lado se ha observado una menor fosforilación del receptor de insulina (Harlev y Wiznitzer, 2010).

El interés se ha centrado en una serie de mediadores relacionados con el tejido adiposo, que están implicados en la insulino resistencia, como la adiponectina, resistina y leptina. La adiponectina es una adipocitoquina que ha demostrado tener papeles antiaterogénicos, antiinflamatorios y antidiabéticos en concentraciones adecuadas, y se demostró en un trabajo realizado por Cortelazzi et al. (2007), en donde se encontró que los niveles de adiponectina fueron significativamente más bajos en mujeres embarazadas diagnosticadas con diabetes gestacional que en embarazadas normales.

Finalmente, también relacionado con el tejido adiposo, la obesidad puede desencadenar estrés inflamatorio, metabólico, oxidativo y estrés de retículo endoplásmico en el tejido adiposo. Las rutas de señalización de estrés constituyen la fosforilación basada en la activación de cinasas en respuesta a estímulos intra y extracelulares. La activación de cinasas conduce a la fosforilación de diferentes proteínas sobre residuos de Ser/Thr, alterando su función. Además, se ha observado en diferentes estudios, que la activación de cinasas en el tejido adiposo conduce a infiltración de macrófagos en la grasa intraabdominal omental. Estudios recientes han mostrado evidencia que estas rutas en pacientes obesos con grasa

omental se asocian fuertemente con marcadores clínicos de morbilidad y es un marcador que predice la sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo, por lo que esta condición es un factor muy importante de riesgo para desarrollar diabetes gestacional (Harlev y Wiznitzer, 2010).

1.2.4 Otros tipos específicos de DM

En este grupo clasificatorio de la DM se reúnen situaciones clínicas con diagnóstico de DM que no tienen relación entre ellas. En esta clasificación se encuentran defectos genéticos de las células β (diabetes tipo MODY), defectos en la acción de la insulina de etiología genética, inducida por enfermedades del páncreas exocrino, inducida por endocrinopatías, inducida por fármacos u otras sustancias químicas, inducida por infecciones (principalmente víricas), formas frecuentes de diabetes mediadas por inmunidad y otros síndromes genéticos, a veces asociados a diabetes, como el síndrome de Down, Klinefelter, Turner, Wolfram, entre otros (Tébar y Escobar, 2009).

1.3 Diagnóstico de la DM

Uno de los primeros indicios de que una persona está cursando con DM, es la aparición de ciertos síntomas característicos, como la polifagia, que es un aumento de apetito, la polidipsia, que es un incremento en el consumo de líquidos, la poliuria, que es un aumento en el número de micciones diarias, la astenia que es cansancio o fatiga general y la pérdida de peso (IDF, 2019).

El diagnóstico definitivo de la DM se da mediante una serie de pruebas que incluyen mediciones de glucosa en plasma en ayunas, glucosa en plasma a las dos horas de una sobrecarga oral de glucosa de 75 g, niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) y glucosa en plasma aleatoria (IDF, 2019).

Tabla 1. Valores de referencia normales y anormales de glucosa.

Prueba	Valores normales	Valores anormales (DM)
Glucosa en ayuno	80-100 mg/dL	≥ 126 mg/dL
Glucosa postprandial	Menor a 140 mg/dL	≥ 200 mg/dL
Hemoglobina HbA1c	Menor a 5.7%	Equivalente a 6.5%
Glucosa aleatoria	Menor a 125 mg/dL	≥ 200 mg/dL

Para considerar un paciente como diabético, debe cumplir al menos uno de los criterios anormales mencionados en la tabla, acompañado de los síntomas característicos de la DM (IDF, 2019).

1.4 Complicaciones de la DM

Las complicaciones de la DM se clasifican en agudas y crónicas, y a su vez las complicaciones crónicas se clasifican en macrovasculares y microvasculares, dependiendo del calibre de la vasculatura que se ve afectado.

1.4.1 Complicaciones agudas de la DM

Las complicaciones agudas de la DM comprenden la cetoacidosis diabética (CAD) y el estado hiperosmolar hiperglucémico (EHH). Si el diagnóstico de la DM se retrasa, normalmente se acumulan cuerpos cetónicos, o se produce lo que se denomina CAD. La lipólisis provocada por la deficiencia de insulina, estimula un aumento de la oxidación hepática de ácidos grasos, lo que determina la formación de cuerpos cetónicos (acetona, β -hidroxibutirato y acetoacetato), lo que conduce al desarrollo de acidosis metabólica. La aparición del EHH puede ser insidiosa, pero puede evolucionar a una profunda deshidratación y a la pérdida de electrolitos, con el riesgo de padecer otras complicaciones. Este estado se presenta casi exclusivamente en los ancianos con DM2 y puede provocar incluso disminución del estado de conciencia y puede estar o no acompañada de una mínima cetoacidosis (Chawla, 2013).

1.4.2 Complicaciones crónicas de la DM

Las complicaciones microvasculares y macrovasculares, las cuales se manifiestan como complicaciones crónicas de la DM dan cuenta ampliamente de la mortalidad y la morbilidad relacionadas con la diabetes. Denominamos complicaciones microvasculares a aquellos cuadros en los que predomina la afectación de la microcirculación. Por el contrario, si la alteración se produce en los vasos de mayor calibre, hablamos de complicaciones macrovasculares. En la actualidad, las complicaciones crónicas de la DM constituyen un problema sanitario de primer orden, tanto por su morbimortalidad como por el coste socioeconómico que conllevan (IDF, 2019).

Dentro de la clasificación de complicaciones microvasculares, está la nefropatía diabética, retinopatía diabética y neuropatía diabética.

La nefropatía diabética se manifiesta como consecuencia de una interacción entre factores metabólicos y hemodinámicos, los cuales activan vías comunes que culminan en daño renal. Patológicamente, los cambios que se presentan en el riñón de los pacientes con nefropatía diabética comprenden: incremento del grosor de la membrana basal glomerular, formación de microaneurismas y formación de nódulos mesangiales (cuerpos de Kimmelstein-Wilson). A nivel molecular, los diversos mecanismos que conducen a la nefropatía diabética están mediados obviamente a la hiperglucemia, la cual incrementa la producción de ER y PFGA (Sulaiman, 2019).

La retinopatía diabética es la principal causa de graves daños visuales en adultos. Incluida en la llamada enfermedad ocular del diabético (junto a la catarata diabética, el glaucoma y la neuropatía de los nervios oculares), aparece en todas las formas de DM y puede permanecer asintomática en muchas fases de su evolución. La retinopatía parece afectar al 60% de los pacientes con un historial de DM de más de 15 años y al 90% de los pacientes con 25 años de padecer DM. Una hiperglucemia prolongada provoca daño microvascular en los ojos, especialmente en los pequeños vasos sanguíneos de la retina, lo que conduce a la retinopatía diabética y la consiguiente pérdida de la vista. Los cambios microvasculares también conducen a un debilitamiento de las paredes capilares y formación de aneurismas, los cuales se pueden romper dando por resultado una hemorragia. La isquemia y microinfarto

del tejido retiniano puede conducir a una neovascularización y por consiguiente, formación de tejido de cicatrización y un posible desprendimiento de retina (Wang y Lo, 2018).

La neuropatía diabética es una de las complicaciones más frecuentes de la DM. La incidencia de neuropatía diabética se incrementa en la evolución de la enfermedad, de tal forma que a los 25 años del diagnóstico, un 50% de diabéticos padecen neuropatía diabética. La elevada prevalencia de la neuropatía diabética conlleva a una importante morbilidad, sobre todo en relación con determinadas patologías asociadas, como el pie diabético. El principal mecanismo de la neuropatía diabética es la hiperglucemia crónica que activa la vía de los polioles a nivel de neuronas y células de Schwann, lo cual conduce a una depleción del mioinositol y secundariamente a una alteración de la conducción nerviosa. Asimismo, la producción de PFGA en las estructuras neuronales y en los vasa nervorum, alteran el funcionamiento nervioso y favorecen la aparición de fenómenos isquémicos. Otro mecanismo importante es el estrés oxidativo, que exacerba los daños a nivel neuronal (Feldman et al., 2019).

En las complicaciones macrovasculares está la cardiopatía diabética, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica.

La asociación entre la DM y la enfermedad de arterias coronarias, se han establecido ampliamente. Los pacientes con DM tienen un riesgo de 2 a 3 veces mayor de padecer enfermedad de arterias coronarias en comparación con personas no diabéticas. La enfermedad de arterias coronarias representa la primera causa de muerte entre la población con diabetes. La prevalencia de la enfermedad de arterias coronarias tiene una correlación con la edad y la duración de la diabetes. Los estados de aterogénesis e hipercoagulación mediadas por la diabetes contribuyen al desarrollo de la enfermedad de arterias coronarias (Chawla, 2013).

La enfermedad cerebrovascular asociada con la diabetes está relacionada con el exceso de glucosonilación, disfunción endotelial, incremento de la agregación plaquetaria, fibrinólisis anormal y resistencia a la insulina. El enfoque terapéutico para la prevención de las enfermedades cerebrovasculares incluye medidas de prevención primaria como el ejercicio, la pérdida de peso y el tratamiento de la dislipidemia, que han mostrado tener un efecto positivo (Chawla, 2013).

Se ha encontrado que la enfermedad arterial periférica, aunada a la neuropatía periférica, ulceraciones de la piel o la amputación de extremidades inferiores son dos veces más comunes en las diabéticas en comparación con las personas no diabéticas, y afecta al 30% de los diabéticos mayores de 40 años. Los signos de la enfermedad arterial periférica comprenden la claudicación, pérdida de vellos del pie, llenado capilar retardado, rubor dependiente y ausencia de pulsos periféricos (Newman et al., 2016).

1.5 Implicaciones de la DM en el cerebro

1.5.1 El cerebro

El cerebro constituye el elaborado extremo superior del eje cerebroespinal, y representa aproximadamente el 2% del peso corporal total. Ocupa casi completamente la cavidad craneal y hace indentaciones en la parte interna de los huesos craneales. La parte superior del sistema nervioso central ubicada dentro del cráneo está compuesto por el cerebro, cerebelo y el tronco encefálico (Hines, 2018).

1. Cerebro. El cerebro es la parte más grande, y está formado por los dos hemisferios cerebrales, masas redondeadas y simétricas de tejido nervioso con circunvalaciones que guarda las partes inferiores del cerebro. Los dos hemisferios están separados por una profunda fisura que se conectan en la base de esta hendidura por un gran puente de fibras llamado cuerpo caloso. La superficie del cerebro se llama corteza. Tiene una apariencia plegada con valles y colinas. Las células nerviosas colorean la corteza gris-marrón, dándole su nombre: materia gris. Debajo de la corteza se encuentra la materia blanca, compuesta de grandes fibras nerviosas que conectan las áreas cerebrales unas con otras. Los pliegues de la corteza incrementan el área superficial del cerebro, permitiendo que más neuronas puedan encajar dentro del cráneo. Los hemisferios cerebrales tienen distintas fisuras, las cuales dividen el cerebro en lóbulos. Cada hemisferio tiene cuatro lóbulos, el lóbulo frontal, el lóbulo temporal, el lóbulo occipital y el lóbulo parietal (Hines, 2018).

En el cerebro se encuentran estructuras profundas, que se describen a continuación: (1) Hipotálamo, está ubicado en el piso del tercer ventrículo y es el control maestro del sistema autónomo. (2) Glándula pituitaria, se encuentra en un pequeño bolsillo de hueso en la base del cráneo llamado silla turca. Conocida como la “glándula maestra”, controla otras glándulas endocrinas en el cuerpo. (3) Glándula pineal, está ubicada detrás del tercer ventrículo. Ayuda a regular el ritmo circadiano secretando melatonina. (4) Tálamo, sirve como estación de retransmisión para casi toda la información que llega y va hacia la corteza. (5) Ganglios basales, incluye el núcleo caudado, el putamen y el globo pálido. (6) Sistema límbico, se incluyen en este sistema la corteza cingulada, el hipotálamo, la amígdala y el hipocampo (Hines, 2018).

2. Cerebelo. Se encuentra debajo del cerebro. Su función es coordinar los movimientos musculares, mantener la postura y el balance (Hines, 2018).

3. Tronco encefálico. Actúa como un centro de retransmisión conectando el cerebro y el cerebelo a la médula espinal (Hines, 2018).

Ventrículos. El cerebro tiene cavidades huecas llenas de líquido llamadas ventrículos. Hay dos ventrículos profundos dentro de los hemisferios cerebrales llamados ventrículos laterales. Ambos se conectan con el tercer ventrículo a través de una abertura llamada agujero de Monro. El tercer ventrículo se conecta con el cuarto ventrículo a través de un tubo largo y estrecho llamado acueducto de Sylvius (Hines, 2018).

Meninges. El cerebro y la médula espinal están cubiertos y protegidos por tres capas de tejido conectivo llamadas meninges. Desde la capa más externa hacia la más interna están: la duramadre, la aracnoides y la piamadre (Hines, 2018).

Todos los organismos con un sistema nervioso central bien desarrollado tienen una barrera hematoencefálica (BHE). En el cerebro y la médula espinal de los mamíferos, incluidos los humanos, la BHE es creada por las células endoteliales que forman las paredes de los capilares. La función de la BHE resulta de una combinación de barrera física (uniones estrechas entre las células que reducen el flujo a través de la hendidura intercelular o la vía paracelular), barrera de transporte (mecanismos de transporte específico que median el flujo de soluto) y barrera metabólica (enzimas que metabolizan moléculas en tránsito) (Abbott et al., 2010).

La irrigación arterial principal del cerebro, procede de la arteria anterior, media y posterior que se dirigen a las zonas frontal, parieto-temporal y occipital del cerebro. Las venas principales forman senos, que corren entre las capas de la duramadre para drenar en la yugular interna. El seno sagital superior de la bóveda, cuyo trayecto comprende toda la longitud del cerebro desde la parte anterior hasta la posterior entre los hemisferios, también drena líquido cefalorraquídeo, que es reabsorbido constantemente (Le Vay, 2008).

El líquido cefalorraquídeo protege el cerebro y la médula espinal contra las conmociones cerebrales o los cambios violentos de posición. Se mantiene normalmente a una presión constante que se relaciona con la presión de la sangre en las grandes venas, y aumenta cuando la tensión venosa se incrementa (Le Vay, 2008).

El cerebro está formado por una enorme variedad de tipos celulares diferentes, cuya propiedad más destacada es la comunicación. La modulación de su estructura, las funciones de integración y sus conexiones, así como moléculas señales que sintetizan, liberan y receptan, responden a la existencia de células neuronales o neuronas, especializadas para cumplir con estos fines, y de células gliales que participan como elementos esenciales de sostén, trofismo y defensa (Eynard et al., 2008).

La neurona es la unidad anatómica, funcional y trófica del cerebro y el sistema nervioso, que funcionalmente se caracteriza por su capacidad para receptor estímulos tanto del organismo como del exterior. Estas señales son transformadas en impulsos nerviosos que se transmiten a lo largo de prolongaciones neuronales hacia poblaciones de neuronas que se encargan de elaborar una respuesta que, a su vez, es transmitida a otras neuronas o células “blanco” en diversos sitios del organismo. La función de comunicación de la neurona depende no solo de su capacidad para receptor y transmitir señales, sino también de su estructura, de sus propiedades de integración y de sus conexiones, así como de las señales químicas que sintetiza y transporta hacia otras neuronas, células musculares y glándulas. Estas moléculas neuroactivas desarrollan varios tipos de actividades clave del tejido nervioso. Actúan como neurotransmisores en forma rápida para modificar la actividad de las células a las que están dirigidos (Eynard et al., 2008).

Las células gliales a su vez se subdividen en una gran variedad de tipos celulares, que son los siguientes: 1) Astrocitos, son las células gliales más abundantes y se denominan de esta manera por su forma estrellada, se ha propuesto que los astrocitos tienen un papel en la nutrición de la neurona. 2) Oligodendrocitos, más pequeños que los astrocitos, forman la cubierta axónica de mielina en el sistema nervioso central. 3) Microglia, son células

pequeñas, tienen un cuerpo alargado y escaso citoplasma, poseen pocas prolongaciones con muchas ramificaciones finas y cortas que, los microgliocitos son los macrófagos del tejido nervioso. 4) Células ependimarias, son células cilíndricas que forman la capa epitelial que reviste las cavidades del cerebro, los ventrículos cerebrales y la médula espinal. 5) Astroglia, son células gliales satélite que cubren y protegen las neuronas del sistema nervioso periférico. 6) Células de Schwann, en el sistema nervioso periférico las células de Schwann hacen las mismas funciones que las diferentes células gliales del sistema nervioso central, como fagocitar y formar la cubierta de mielina alrededor de los axones (Eynard et al., 2008).

Funcionalmente, el cerebro es el órgano central, ya que se encarga de regular todas las funciones del organismo, en él se sintetizan varias hormonas y neurotransmisores que lo comunican con otros tejidos y le permiten regular sus funciones. Procesa y responde todos los estímulos sensoriales. Regula todas las funciones vitales del organismo, por ejemplo, la respiración y el ritmo cardíaco. Por tal motivo, si el cerebro tiene algún daño puede ser perjudicial para todo el organismo.

1.5.2 Metabolismo cerebral

Metabólicamente el cerebro es un órgano muy activo y demanda grandes cantidades de energía. El cerebro utiliza aproximadamente el 20% de oxígeno y 25% de glucosa total, a pesar de que solo representa aproximadamente el 2% del peso total corporal, siendo la glucosa la principal fuente de energía (Nagalski et al., 2016). Los diferentes tipos de células en el cerebro tienen distintos perfiles metabólicos, que han sido principalmente estudiados en neuronas y astrocitos (Nagalski et al., 2016). Las neuronas sostienen una alta tasa de metabolismo oxidativo comparado con las células gliales, las cuales se caracterizan por un alta tasa glucolítica (Harris et al., 2012). Una gran porción de la glucosa que entra a la ruta glucolítica en los astrocitos, es liberada como lactato en el espacio extracelular, el cual es utilizado por las neuronas como fuente de energía, además, los astrocitos presentan un pequeño almacén de glucógeno (Nagalski et al., 2016). También durante periodos de inanición prolongada, las células cerebrales pueden utilizar cuerpos cetónicos que se producen en el hígado como fuente de energía.

La mayor proporción de energía en el cerebro es consumida para la computación neuronal y procesamiento de información; por ejemplo, la generación de potenciales de acción y postsinápticos generados después de eventos sinápticos, y el mantenimiento de gradientes iónicos y potencial de reposo neuronal. Además, el metabolismo de la glucosa provee la energía y los precursores para la biosíntesis de neurotransmisores (Mergenthaler et al., 2013).

1.5.2.1 Transporte de glucosa

La glucosa es el principal combustible no solo del cerebro, sino de la mayoría de los tejidos y órganos. Para que sea metabolizada y por lo tanto, se pueda obtener energía, es necesario que ingrese a las células. Para que la glucosa pueda ingresar a las células, es necesario que existan transportadores proteicos específicos, debido a la imposibilidad de la glucosa por atravesar la bicapa lipídica. Estos transportadores pueden ser independientes de

sodio (GLUT) o dependientes de sodio (SGLT). Hasta el momento, se conocen catorce tipos de GLUT diferentes, que son expresados en diferentes órganos y tejidos (Thorens y Mueckler, 2010), y solo uno (GLUT4) es sensible a la insulina. El transporte de glucosa a través de los GLUT es un transporte del tipo uniporte facilitado y se da a favor del gradiente de concentración.

Mientras tanto, se han identificado tres tipos de SGLT, que tienen la función de un cotransportador de sodio y glucosa, que acopla el ingreso de sodio para poder ingresar la glucosa en contra de su gradiente de concentración (Wright et al., 2011).

1.5.2.2 Transporte de glucosa en el cerebro

En el cerebro se expresan principalmente GLUT1 y GLUT3, y en menor proporción se expresan GLUT6, GLUT8 y GLUT9. GLUT1 se expresa principalmente en las células gliales, sobre todo en los astrocitos y las células epiteliales que forman la barrera hematoencefálica. GLUT3 se expresa en las neuronas y tiene una mayor afinidad por la glucosa y mayor capacidad de transporte (Nagalski et al., 2016).

El cerebro requiere un suministro constante de glucosa porque puede almacenar solo una poca cantidad de glucógeno en los astrocitos (Sickmann et al., 2009; Brown et al., 2005; Wender et al., 2000). Primero, la glucosa es transportada a través de la barrera hematoencefálica mediante los transportadores GLUT1, las cuales son expresadas en las células endoteliales vasculares. Una vez que la glucosa se encuentra en el espacio extracelular, es captada por las diferentes células, por las neuronas mediante el transportador GLUT3 y por las células gliales mediante los transportadores GLUT1, principalmente (Kobayashi et al., 1996; Bondy et al., 1992). Una vez que la glucosa se encuentra en las células, esta será metabolizada y se utilizará para los diferentes procesos ya mencionados.

1.5.3 Cambios metabólicos en el cerebro inducidos por la DM

El ingreso de glucosa al cerebro a través de la barrera hematoencefálica por los transportadores GLUT1, depende de la concentración de glucosa en sangre, el cual es estrictamente regulado por respuestas endócrinas (Nagalski et al., 2016). Un aumento en los niveles de glucosa sérica debido a la DM provoca que los niveles de glucosa también aumenten en diferentes tejidos y órganos, especialmente aquellos que no dependen de insulina para su ingreso, como el cerebro. Los niveles elevados crónicos de glucosa debidos a la DM son muy peligrosos para las células tanto cerebrales como de otros tejidos, ya que por diferentes vías pueden causar varios daños y además producir una gran cantidad de especies reactivas que son moléculas pequeñas producidas a partir de oxígeno y/o nitrógeno, como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO^{\bullet} , H_2O_2 , $^{\bullet}ONOOR$, etcétera. Estas moléculas son altamente reactivas, y pueden reaccionar con cualquier macromolécula afectando su estructura y función normal, y además, exacerban las complicaciones y el daño producido por la diabetes (Islam, 2016).

Las especies reactivas a concentraciones fisiológicas juegan papeles importantes en procesos fisiológicos, por ejemplo, rutas de señalización, inducción de respuesta mitogénica,

defensa contra patógenos infecciosos, pero una sobreproducción y el fracaso de las defensas antioxidantes, conducen a daño oxidativo en todos los componentes celulares (Islam, 2016).

1.5.3.1 Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos esféricos de doble membrana (interna y externa), se encuentran en la mayoría de las células de mamíferos, a excepción de los eritrocitos (Gahl, 2017). La membrana mitocondrial externa contiene porinas que permiten el paso de moléculas menores a 5 kilodaltons; también contiene un gran complejo de translocasas multiproteicas que reconoce secuencias señal mitocondriales. La membrana mitocondrial interna contiene todos los componentes del sistema de transporte de electrones y el complejo ATP sintasa; la membrana interna está dispuesta en crestas para aumentar el área de superficie disponible para la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa. Las membranas dobles forman dos compartimentos mitocondriales: el espacio intermembrana, ubicado entre las membranas mitocondriales interna y externa, y la matriz, ubicada dentro de la membrana interna, en donde está alojado el ADN mitocondrial (Chial y Craig, 2008).

Las mitocondrias generan energía a medida que los electrones pasan de donantes de bajo potencial redox, a receptores con potencial redox más alto a través de varios complejos proteicos (Sivitz y Yorek, 2010). Las mitocondrias utilizan oxígeno como aceptor final de electrones, y, aunque la mayoría de los electrones que fluyen a través de los complejos de la cadena transportadora de electrones, se transfieren al oxígeno molecular en el complejo IV para formar agua, una pequeña porción se escapa durante el transporte (Sivitz y Yorek, 2010). Esta fuga de electrones da como resultado una reducción electrónica de oxígeno para formar el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que posteriormente, se convierte en otras especies reactivas. Las mitocondrias constituyen la principal fuente de especies reactivas en la célula. La hiperglucemia crónica producida por la DM en tejidos independientes de insulina (como el cerebro) para la captación de glucosa, generan mayor cantidad de sustratos mitocondriales para alimentar la cadena transportadora de electrones, y así se incrementa la producción de ER (Du et al., 2003; Nishikawa et al., 2000).

El incremento del ingreso de glucosa a las células no insulino dependientes, y los productos de su metabolismo provocado por la DM, está estrechamente asociada con un incremento del flujo electrónico a través de la cadena transportadora de electrones, y por lo tanto, una mayor fuga de electrones (Sivitz y Yorek, 2010). Otro punto importante en el mayor flujo de sustratos hacia la mitocondria es que esto genera un incremento en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Este incremento en el $\Delta\Psi_m$ generado por el gradiente de protones da como resultado una producción elevada de ATP, pero una capacidad reducida de transporte de electrones, lo que conduce a una gran producción de especies reactivas (Newsholme et al., 2007), especialmente a nivel del complejo I y el complejo III. Primero, se demostró que el radical de la ubiquinona (UQ), el radical ubisemiquinona (QH^{\bullet}), en el complejo I, puede reaccionar con oxígeno y formar $O_2^{\bullet-}$. También se ha sugerido que los centros hierro-azufre del complejo I pueden donar electrones al oxígeno, probablemente ante la modificación del sitio de unión a UQ por la alta producción de ER, lo que implica una mayor producción. Se ha demostrado que el complejo III también produce una gran cantidad

de $O_2^{\bullet-}$, principalmente producida a partir del radical inestable $Q^{\bullet-}$ formado en el ciclo Q, que puede ceder fácilmente su electrón desapareado al oxígeno. Además, en el ciclo Q, un elevado $\Delta\Psi_m$ podría implicar la conversión del citocromo de bajo potencial b_L al citocromo de alto potencial b_H , prolongando el tiempo de vida de la $Q^{\bullet-}$ (Sivitz y Yorek, 2010). Por otro lado, en un trabajo realizado por Chowdhury y col. (2017), demostraron una disminución en la actividad enzimática de los complejos de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias de corteza cerebral de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), además realizaron un análisis Western blot y encontraron una disminución significativa de algunos componentes de los complejos de la cadena transportadora de electrones como NDUFB8 (componente del complejo I), SDHB (componente del complejo II).

Asimismo, Cortés-Rojo et al. (2009) demostraron que la peroxidación de lípidos producto de la modificación de lípidos poliinsaturados con especies reactivas, induce cambios estructurales y funcionales tanto en el complejo III como en el IV, haciéndolos más susceptibles al estrés oxidativo y la fuga de electrones que conduce a una mayor formación de ER. En este contexto, el cerebro tiene un gran contenido en lípidos poliinsaturados, lo que lo hace muy susceptible al daño oxidativo.

1.5.3.2 Ruta de los polioles

La ruta de los polioles consiste de dos reacciones enzimáticas. La primera enzima, aldosa reductasa (AR), reduce glucosa a sorbitol con la ayuda de su cofactor NADPH, y la segunda enzima, sorbitol deshidrogenasa (SDH), con su cofactor NAD^+ , convierte sorbitol a fructosa (Chung et al., 2003). La ruta de los polioles constituye una gran fuente de estrés oxidativo ante un aumento de los niveles de glucosa producido por la diabetes, y se han descrito 3 mecanismos por los cuales esta ruta contribuye al estrés oxidativo. (1) La actividad de la AR agota su cofactor NADPH, el cual también se requiere para regenerar glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares. Bajo condiciones de hiperglucemia, aproximadamente el 30% de la glucosa es canalizada hacia la ruta de los polioles, causando una sustancial depleción de NADPH y consecuentemente, una disminución significativa del nivel de GSH. Así, durante la hiperglucemia, la actividad de la AR disminuye la capacidad antioxidante celular (Chung et al., 2003). (2) La oxidación de sorbitol a fructosa por la SDH causa estrés oxidativo porque su cofactor NAD^+ es convertido a NADH en el proceso, y el NADH es sustrato de la NADPH oxidasa (NOX) para generar ER (Morre et al., 2000). (3) La ruta de los polioles convierte glucosa a fructosa. Debido a que la fructosa y sus metabolitos fructosa-3-fosfato y 3-desoxiglucosona son agentes de glicación no enzimática más potentes que la glucosa, el flujo de glucosa a través de la ruta de los polioles aumentaría la formación de PFGA. se sabe que los productos finales de glucosilación avanzada (PFGA), así como la unión de los PFGA a sus receptores causan estrés oxidativo (Chung et al., 2003). Experimentalmente, Chung et al. (2003), demostraron la implicación de la ruta de los polioles a contribuir en el estrés oxidativo en condiciones diabéticas, ya que utilizaron un modelo de roedores con knockout del gen que codifica para la AR inducidos a diabetes, contra roedores wild type también diabéticos, y midieron los niveles de GSH. Sus resultados mostraron que los roedores con el knockout en la AR no presentaron disminución en los niveles de GSH, mientras que en los roedores wild type hubo

una disminución de aproximadamente del 40% de los niveles de GSH, con lo cual se puede demostrar la relevancia de esta ruta en la disminución de las defensas antioxidantes celulares y por lo tanto, una mayor susceptibilidad a daños producidos por ER.

1.5.3.3 Productos finales de glucosilación avanzada

Los PFGA son el resultado de los procesos de glicación y glucoxidación no enzimática, y se forman en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en un entorno pro oxidante, lo que afecta su estructura y por lo tanto, su funcionalidad (Bierhaus y Nawroth, 2009). La formación de PFGA es mayor con hiperglucemia crónica concomitante y recambio molecular retardado (Bierhaus y Nawroth, 2009). Además, los PFGA pueden unirse al receptor RAGE, que induce inflamación a través de la activación persistente del factor de transcripción proinflamatorio, NF- κ B, producción de ER, niveles elevados de ERK 1/2, nueva síntesis de p65 (Bierhaus et al., 2005; Bierhaus et al., 2001; Yan et al., 2009; Coughlan et al., 2009; Li et al., 2004). Se ha propuesto que la activación de RAGE contribuye a las complicaciones de la DM induciendo señales inflamatorias y una mayor formación de ER (Bierhaus y Nawroth, 2009).

1.5.3.4 Vía de la hexosamina

Un incremento en el flujo glucolítico producido por la DM estimula la ruta de la hexosamina, en la cual la fructosa-6-fosfato y la Gln son convertidos por la enzima GFAT a glucosamina-6-fosfato y Glu, mediante otras reacciones la glucosamina-6-fosfato se transforma en UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilgalactosamina (Horal et al., 2004). Un incremento del flujo de la vía de la hexosamina puede conducir a N-glucosilación y O-glucosilación de proteínas (Wells et al., 2001). La glucosilación de proteínas puede tener efectos adversos, por ejemplo la O-glucosilación de residuos de Ser o Thr de proteínas citosólicas o nucleares puede tener efectos adversos directos sobre la señalización celular (Wells et al., 2001).

1.5.3.5 Vía de PKC

Las proteínas cinasas C (PKC) son una familia de Ser/Thr cinasas que consisten de 15 isoformas (Yuan et al., 2019). Las isoformas de PKC están clasificadas de acuerdo a si contienen dominios que unen Ca^{2+} o diacilglicerol (DAG). Ambas, regulan positivamente la actividad cinasa (Noh y King, 2007). La activación convencional de PKC requiere la correcta fosforilación de las isoformas y la presencia de cofactores como Ca^{2+} y DAG (Noh y King, 2007). Se ha encontrado que los niveles elevados de glucosa a causa de la DM aumentan el contenido de DAG a través de varias vías (Noh y King, 2007). Una es por incremento de la síntesis *de novo* de DAG del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato (Inoguchi et al., 1992). La activación de la señalización de PKC debido a la hiperglucemia conduce al incremento en la producción de ERO, que ha sido asociado con la pérdida de la subunidad p47phox de la NOX, y la inducción de PFGA contribuye al estrés oxidativo relacionado con NADPH (Yuan et al., 2019). También mediante esta vía se promueve la transcripción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-18 (Yuan et al., 2019).

1.6 Sistemas antioxidantes

Como ya se mencionó, los cambios metabólicos producidos por la DM inducen la activación de diversas rutas que generan una gran cantidad de ER, que son perjudiciales a nivel estructural y funcional de todas las biomoléculas celulares, y posteriormente, este incremento puede reflejarse en las complicaciones inducidas por la DM a nivel cerebral. Pero para prevenir y revertir el daño producido por una cantidad elevada de ER, las células cuentan con sistemas antioxidantes. Un antioxidante se define como una molécula que puede neutralizar una ER y transformarla en una molécula que ocasiona un daño menor o nulo a las células (Bunaciu et al., 2015).

Los antioxidantes se dividen en dos categorías, enzimáticos y no enzimáticos. Algunos de ellos son producidos endógenamente tales como enzimas, moléculas de bajo peso molecular y cofactores enzimáticos, mientras que otros antioxidantes no enzimáticos se obtienen de fuentes dietéticas. Los antioxidantes dietéticos se pueden clasificar en varias clases, de los cuales los polifenoles, es decir ácidos fenólicos y flavonoides, es la clase más grande. Las otras clases de antioxidantes en la dieta incluyen vitaminas, carotenoides, compuestos organosulfurados y minerales (Bunaciu et al., 2015).

Los antioxidantes enzimáticos son la primera línea de defensa del organismo ante los insultos oxidativos, en esta clasificación de antioxidantes encontramos enzimas como la SOD que se encarga de dismutar al $O_2^{\bullet-}$ (producido principalmente en la mitocondria) en H_2O_2 , la CAT que transforma el H_2O_2 en H_2O y O_2 , la GR que se encarga de regenerar al GSSG en su forma reducida, la GPx se encarga de la reducción de H_2O_2 en H_2O , las TRx que son enzimas que actúan facilitando la reducción de otras proteínas a través de un intercambio tiol-disulfuro en el aminoácido Cys (Birben et al., 2012).

Mientras que los antioxidantes no enzimáticos son muy diversos, y se clasifican en antioxidantes de bajo peso molecular, vitaminas, minerales, carotenoides, polifenoles, cofactores y compuestos organosulfurados, algunos de ellos son endógenos, como el GSH, que es un tripéptido muy abundante en todos los compartimentos celulares y juega un papel fundamental en la defensa ante el estrés oxidativo, debido a que desintoxica el H_2O_2 y los lipoperóxidos mediante la acción de la GPx, el GSH se regenera en su forma reducida mediante la acción de la GR (Birben et al., 2012). Otros antioxidantes son exógenos y se pueden obtener al consumirlos en la dieta, como las vitaminas, carotenoides o polifenoles, su importancia y mecanismo de acción será presentado más adelante (Birben et al., 2012).

1.7 Desbalance entre la producción de especies reactivas y la actividad de los sistemas antioxidantes inducida por la diabetes y su implicación en trastornos cerebrales.

Como ya se ha descrito previamente, la DM provoca un gran número de cambios metabólicos y activación de varias rutas que inducen una sobreproducción de ER (principalmente en la mitocondria), las cuales provocan que los sistemas antioxidantes sea incapaz de neutralizarlos, e incluso que pueda disminuir su concentración, como en el caso del GSH que no puede ser regenerado por la AR, ya que el NADPH necesario para la reducción de GSH es consumido en su mayor parte por la ruta de los polioles. Ante el

aumento de ER y la incapacidad de los sistemas antioxidantes de neutralizarlas, las ER comienzan a reaccionar rápidamente con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando su funcionamiento.

El cerebro es especialmente susceptible al estrés oxidativo debido a su alta tasa de consumo de oxígeno, un modesto sistema antioxidante comparado con otros tejidos y su alto contenido de lípidos poliinsaturados (Hulbert et al., 2007). Las neuronas poseen ~50% menos contenido de CAT que los hepatocitos, así mismo el nivel de GSH también es ~50% menor en neuronas comparado con otras células, por ejemplo ~5 mM en neuronas comparado con 10-11 mM en hepatocitos (Cobley et al., 2018). El cerebro es el órgano que posee una mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados n-3, principalmente ADH haciéndolo muy susceptible al estrés oxidativo (Cobley et al., 2018).

El desarrollo de la DM en pacientes por varios años de padecerla, se ha asociado a varios trastornos a nivel cerebral. Los efectos crónicos de la hiperglucemia se han asociado con decline cognitivo (Nagalski et al., 2016). Además, se demostró que los PFGA conducen a respuesta inflamatoria (Ott et al., 2014). La hiperglucemia recurrente debida a la DM, progresivamente compromete el endotelio vascular (Vinik y Flemmer, 2002). Se han observado que las fallas en la micro y macrovasculatura en el cerebro de individuos con DM2 (Li et al., 2015) pueden conducir a neurodegeneración en el cerebro (Tennant y Brown, 2013). El incremento de ER también está asociado a múltiples trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o demencia (Islam, 2016). En este contexto, los daños producidos por la DM y además, un aumento de ER que puede ser causada por la DM, en conjunto ambos factores predicen un severo daño en el cerebro ocasionado por el desarrollo de varios años de la DM.

1.8 Tratamiento farmacológico de la DM

La DM es un trastorno que no tiene cura, solo puede ser controlada, debido a esto, en el tratamiento de la DM se siguen diversas estrategias, desde el tratamiento dietético, la práctica regular de ejercicio físico, y tratamiento farmacológico específico, que se describe a continuación.

Existe una gran cantidad de fármacos efectivos en el tratamiento de la DM, actuando de manera diferente, es por ello que existe una clasificación: (a) Biguanidas. Las biguanidas actúan principalmente a dos niveles, músculo e hígado. En el músculo aumenta la captación y utilización tisular de la glucosa, incrementando la sensibilidad a la insulina. En el hígado, disminuye la producción de glucosa al reducir principalmente la gluconeogénesis y, en menor medida, reduciendo la glucogenólisis. (b) Inhibidores de α -glucosidasas. Los inhibidores de las α -glucosidasas compiten con los oligosacáridos por la unión a las enzimas presentes en la mucosa intestinal, impidiendo de esta manera la digestión y absorción de los oligosacáridos y disacáridos. (c) Inhibidores de DPP4. La enzima DPP4 desactiva los péptidos PIG y PSG-1. Estos dos péptidos están implicados en la homeostasis de la glucosa, por lo que al ser inhibidos causan una homeostasis de la glucosa deficiente. De esta manera, los inhibidores de DPP4 producen una mejora en la homeostasis de la glucosa (Tébar y Escobar, 2009). (d) Meglitinidas. Actúan como secretagogos de corta duración, que actúan cerrando los canales

de potasio, estimulan la liberación de insulina de manera rápida, pero poco sostenida (Lorenzo et al., 2015). (e) Sulfonilureas. Actúan como secretagogos, inhibiendo los canales de potasio y produciendo una despolarización permanente de la membrana. Esta situación conduce al aumento de calcio citosólico, con la consiguiente liberación de insulina (Moreno et al., 1997). (f) Tiazolidinedionas. Su mecanismo se basa en la activación de los PPAR- γ , aumentando la transcripción de genes, que son importantes reguladores entre otras cosas de la acción de la insulina (Tébar y Escobar, 2009). (g) Insulina. La insulina es la primera línea de tratamiento para pacientes con DM1, debido a la etiología de este tipo de DM, en la cual existe muy poca o nula producción de insulina ante la destrucción de las células β pancreáticas. En la DM2, cuando la terapia con fármacos comienza a no mostrar efectos o debido a la estimulación constante de secretar insulina, las células β llegan a un punto de agotamiento, por lo que también se recomendará el uso de insulina (Moreno et al., 1997).

1.9 La medicina tradicional como una alternativa terapéutica contra la DM

Desde hace muchos años se han utilizado una gran cantidad de plantas para el tratamiento de muchas enfermedades, aunque el crecimiento exponencial de la industria farmacéutica dejó un poco de lado el uso de la medicina tradicional, en los últimos años, la investigación le ha dado importancia al uso de estas alternativas terapéuticas. La medicina tradicional se basa en la preparación de macerados o infusiones de plantas, en los que se pueden extraer una gran cantidad de metabolitos secundarios con acciones farmacológicas y antioxidantes

1.9.1 Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y el desarrollo. Estas sustancias reciben el nombre de metabolitos secundarios. Durante muchos años, el significado adaptativo de muchos metabolitos secundarios era desconocido. Posteriormente, se descubrió que muchos metabolitos secundarios tenían importantes funciones en las plantas, como proteger a las plantas de la ingestión por herbívoros y las infecciones por patógenos microbianos, o como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas, y como agentes en la competencia planta-planta (Taiz y Zeiger, 2006).

Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, compuestos que contienen nitrógeno o alcaloides y compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 2006).

1.9.2 Terpenos

Los terpenos, constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios. Los diferentes compuestos de esta clase son generalmente insolubles en agua. Son biosintetizados a partir de acetyl-CoA o de intermediarios glucolíticos (Taiz y Zeiger, 2006).

Todos los terpenos derivan de la unión de elementos de cinco carbonos que tienen el esqueleto carbonado ramificado del isopentano. Los elementos estructurales básicos de los terpenos se conocen como unidades de isopreno, porque los terpenos pueden descomponerse

a elevadas temperaturas dando isopreno, debido a esto, a los terpenos también se les conoce como isoprenoides (Taiz y Zeiger, 2006).

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen, aunque debido a las numerosas modificaciones metabólicas, se puede hacer difícil reconocer las unidades originales de cinco carbonos. Los terpenos de diez carbonos, que contienen dos unidades C_5 , se denominan monoterpenos, los terpenos de 15 carbonos (3 unidades de C_5) son sesquiterpenos; y los terpenos que tienen 20 carbonos (4 unidades de C_5) son diterpenos. Los terpenos más grandes incluyen triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) y politerpenoides ($[C_5]_n$, cuando $n > 8$) (Taiz y Zeiger, 2006).

1.9.3 Compuestos que contienen nitrógeno o alcaloides

Los alcaloides representan el grupo de metabolitos secundarios que contienen átomos básicos de nitrógeno. Además de carbono, hidrógeno y nitrógeno, este grupo también puede contener oxígeno, azufre y raramente otros compuestos como cloro, bromo y fósforo (Nicolaou et al., 2011). Los alcaloides son producidos por una gran variedad de organismos, como bacterias, hongos, animales, pero principalmente por plantas como metabolitos secundarios. La mayoría de ellos son tóxicos para otros organismos y se pueden extraer mediante mezclas ácido-base (Kabera et al., 2014). Tienen diversos efectos farmacológicos (Aniszewski, 2007), y tienen una larga historia en la medicación.

En comparación con las otras clases de metabolitos secundarios, los alcaloides se caracterizan por una gran diversidad estructural y no existe una clasificación uniforme entre ellos. La primera clasificación se basó en la fuente común por que aún no se disponía de información sobre la estructura química. La clasificación reciente se basa en la similitud del esqueleto de carbono (Savithramma et al., 2011).

1.9.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son uno de los principales componentes de plantas secundarias sintetizadas por frutas, verduras, té, cacao y otras plantas que poseen ciertos beneficios para la salud (Kabera et al., 2014). Se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y otras propiedades biológicas, y pueden proteger contra el estrés oxidativo y algunas enfermedades (Park et al., 2001). Los compuestos fenólicos se distribuyen en casi todas las plantas, por ello, estas plantas están sujetas a una gran cantidad de estudios químicos, biológicos, agrícolas y médicos. Los compuestos fenólicos tienen una estructura diversa y presentan en común los anillos aromáticos hidroxilados. Además, los ácidos fenólicos pueden encontrarse en las plantas como ésteres o glucósidos conjugados con otros compuestos naturales como flavonoides, alcoholes, ácidos grasos hidroxilados, esteroides y glucósidos (Dai y Mumper, 2010). En el té, el café, las bayas y las frutas, los compuestos fenólicos totales podrían alcanzar hasta 103 mg/100 g de peso fresco (Manach et al., 2004). Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10000 compuestos: algunos son solubles solamente en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glucósidos

solubles en agua, mientras que en otros son grandes polímeros muy insolubles (Taiz y Zeiger, 2006).

De acuerdo a su diversidad química, los fenoles tienen funciones muy diversas en las plantas. Muchos tienen papeles de defensa en las plantas contra herbívoros y patógenos. Otros participan en el soporte mecánico, en la atracción de polinizadores y dispersantes de frutos, en la absorción de luz ultravioleta dañina o en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras próximas (Taiz y Zeiger, 2006).

Se ha reportado que compuestos fenólicos y flavonoides actúan como antioxidantes, por ejercer efectos antialérgicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antimicrobianos, antipatogénicos, antivirales, antitrombóticos, y vasodilatadores y previenen enfermedades como el cáncer, problemas cardíacos, cataratas, desórdenes oculares, y Alzheimer. Además, las características más importantes de los flavonoides incluyen su habilidad para proteger contra enfermedades oxidativas, activar o inhibir varias enzimas de unión específica a receptores, y proteger contra enfermedades cardiovasculares reduciendo la oxidación de LDL (Taiz y Zeiger, 2006).

De hecho, Huyut et al. (2017), demostraron el efecto antioxidante de varios compuestos fenólicos, comparado con antioxidantes estándar como el BHT y el α -tocoferol, y se demostró que tuvieron un efecto antioxidante similar al de los antioxidantes ya mencionados en varios ensayos como TAC, quelación de iones Fe^{2+} , DPPH, DMPD, ABTS, neutralización del $O_2^{\bullet-}$, y los ensayos PARF y CUPRAC.

1.9.5 Plantas medicinales usadas para tratar la DM

A pesar del progreso considerable en el tratamiento de la diabetes por agentes hipoglucémicos orales, la búsqueda de medicamentos nuevos continúa porque los medicamentos sintéticos existentes tienen varias limitaciones. Los medicamentos herbales con actividad antidiabética aún no se han formulado comercialmente como medicamentos modernos, a pesar de que han sido aclamados por sus propiedades terapéuticas en los sistemas tradicionales de medicina. La medicina tradicional se usa para el tratamiento de la diabetes en los países en desarrollo, donde el costo de los medicamentos convencionales es una carga económica importante para la población (Arumugam et al., 2013).

Una de las grandes ventajas de las plantas medicinales es que están fácilmente disponibles y tienen efectos secundarios muy bajos. Las plantas siempre han sido una fuente ejemplar de medicamentos y muchos de los medicamentos disponibles, actualmente se han derivado directa o indirectamente de ellos. La información etnobotánica informa sobre 800 plantas que pueden poseer potencial antidiabético. Varias hierbas han mostrado actividad antidiabética cuando se evalúan utilizando técnicas experimentales disponibles (Arumugam et al., 2013).

Tabla 2. Plantas con propiedades antidiabéticas

Nombre de la planta	Familia	Partes usadas	Tipo de extracto	Actividad	Referencia
---------------------	---------	---------------	------------------	-----------	------------

<i>Alangium lamarckii</i>	Alangiaceae	Hojas	Alcohólico	Antidiabético	Kumar et al., 2012
<i>Albizia odoratissima</i>	Mimosaceae	Corteza	Metanólico	Antidiabético	Kumar et al., 2011
<i>Axonopus compressus</i>	Poaceae	Hojas	Metanólico	Antidiabético	Ibeh y Ezeaja, 2011
<i>Berberis vulgaris</i>	Berberidaceae	Raíz	Acuoso	Hipoglucémico	Meliani et al., 2011
<i>Brassica juncea</i>	Cruciferae	Semilla	Acuoso	Hipoglucémico	Thirumalai et al., 2011
<i>Caesalpinia digyna</i>	Fabaceae	Raíz	Metanólico	Antidiabético	Kumar et al., 2011
<i>Cassia auriculata</i>	Caesalpiniaaceae	Hojas	Acuoso	Anti-hiperglucémico	Gupta et al., 2011
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Hojas	Metanólico	Hipoglucémico	Ohadoma y Michael, 2011
<i>Centaurium erythraea</i>	Gentianaceae	Hojas	Acuoso	Antidiabético	Sefi et al., 2011
<i>Chaenomeles sinensis</i>	Rosaceae	Fruta	Acetato de etilo	Antidiabético	Sancheti et al., 2011
<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	Hojas	Hidro-metanólico	Anti-hiperglucémico	Naskar et al., 2011
<i>Costus speciosus</i>	Costaceae	Rizoma	Hexánico	Antidiabético	Eliza et al., 2009
<i>Cyclocarya paliurus</i>	Cyclocaryaceae	Corteza	Acuoso, PE, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol	Hipoglucémico	Li et al., 2011
<i>Dillenia indica</i>	Dilleniaceae	Hojas	Metanólico	Antidiabético	Kumar et al., 2011
<i>Embelia ribes</i>	Myrsinaceae	Bayas	Hexánico	Antidiabético	Mahendran et al., 2011
<i>Enicostemma littorale</i>	Gentianaceae	Toda la planta	Acuoso	Antidiabético	Sonawane et al., 2010
<i>Eryngium carlinae</i>	Apiaceae	Parte aérea	Etanólico	Hipolipemiente	Noriega-Cisneros et al., 2011
<i>Hybanthus enneaspermus</i>	Violaceae	Toda la planta	Alcohólico	Antidiabético	Patel et al., 2011
<i>Lippa nodiflora</i>	Verbenaceae	Toda la planta	Metanólico	Antidiabético e hipolipidémico	Balamurugan e Ignacimuthu et al., 2011
<i>Lithocarpus polystachyus</i>	Fagaceae	Hojas	Etanólico y acuoso	Hipoglucémico	Hou et al., 2011
<i>Marrubium vulgare</i>	Lamiaceae	Parte aérea	Metanólico	Anti-hiperglucémico e hipolipemiente	Elberry et al., 2011
<i>Ocimum sanctum</i>	Lamiaceae	Parte aérea	Hidro-alcohólico	Antidiabético	Patil et al., 2011
<i>Ophiopogon japonicus</i>	Asparagaceae	Raíz	Etanólico	Hipoglucémico	Chen et al., 2011

<i>Opuntia streptacantha</i>	Cactaceae	Hojas	Etanólico	Anti-hiperglucémico	Cetto y Wiedenfeld., 2011
<i>Prosopis glandulosa</i>	Fabaceae	Toda la planta	Gelatina/gelatina	Antidiabético	Georgea et al., 2011
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Fruta	Etanólico	Anti-hiperglucémico	Huang et al., 2011
<i>Semecarpus anacardium</i>	Anacardiaceae	Nuez	Leche	Antidiabético	Hedayathullah et al., 2012
<i>Setaria itálica</i>	Poaceae	Semilla	Acuoso	Anti-hiperglucémico	Sireesh et al., 2011
<i>Solanum torvum</i>	Solanaceae	Fruta	Metanólico	Anti-hiperglucémico	Gandhi et al., 2011
<i>Solanum xanthocarpum</i>	Solanaceae	Hojas	Acuoso y metanólico	Anti-hiperglucémico	Poongothai et al., 2011
<i>Symplocos cochinchinensis</i>	Symplocaceae	Hojas	Hexánico	Antidiabético	Sunil et al., 2011
<i>Vaccinium arctostaphylos</i>	Ericaceae	Fruto	Etanólico	Antidiabético	Feshani et al., 2011
<i>Viscum schimperi</i>	Viscaceae	Parte aérea	Metanólico	Anti-hiperglucémico e hipolipemiente	Sattar et al., 2011
<i>Vitex negundo</i>	Lamiaceae	Hojas	Metanólico	Anti-hiperglucémico	Sundaram et al., 2012
<i>Zygophyllum album</i>	Zygophyllaceae	Toda la planta	Etanólico	Antidiabético	Ghoul et al., 2011

1.9.6 Investigaciones en *Eryngium sp*

El género *Eryngium* consiste de aproximadamente 250 especies en Euroasia, el norte de África, Norte y Sudamérica, y Australia. Es el género más grande y posiblemente el más complejo taxonómicamente de la familia Apiaceae (Wang et al., 2012).

Algunas especies, como *E. foetidum* L., *E. maritimum* L., *E. planum* L., *E. dichotomum* Desf., *E. campestre* L. y *E. creticum* Lam. se han utilizado como alimento o en la medicina tradicional a nivel local o mundial. *E. foetidum* y *E. caucasicum* Trautv. se cultivan como hortalizas de hoja en Asia y África. Los frutos de *E. foetidum* se consumen como alimento en Nigeria. La planta es autóctona de América tropical y la India occidental, donde se usa como medicina y alimento, en algunos lugares han domesticado la planta en sus huertos. Se ha naturalizado, y a menudo se cultiva en Asia meridional, las islas del Pacífico, África tropical y las partes más cálidas del sur de Europa (Wang et al., 2012).

Algunas especies se han utilizado en la medicina tradicional. *E. campestre* se usa en la medicina tradicional turca. Las infusiones de las partes aéreas y radicales se utilizan como antitusivo, diurético, aperitivo, estimulante y afrodisíaco. *E. creticum* se ha utilizado en la medicina tradicional jordana como remedio para las picaduras de escorpiones y como agente hipoglucemiante. *E. elegans* Cham. & Schltld. se informó que se utilizaba para usos diuréticos en Argentina, y *E. foetidum* para el tratamiento de varios trastornos antiinflamatorios en China (Wang et al., 2012).

De las 250 especies del género *Eryngium*, solo 23 especies aproximadamente han sido investigadas fitoquímicamente. Hasta la fecha, se han identificado al menos 127 compuestos, principalmente compuestos fenólicos y terpenoides de estas especies, incluidas las saponinas triterpenoides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenoides, flavonoides, cumarinas, esteroides, acetilenos y otras clases de compuestos (Wang et al., 2012).

Se sabe que el género *Eryngium* contiene saponinas triterpenoides como componentes principales. Hasta la fecha, se han aislado 25 saponinas de este género. La mayoría de las saponinas de *Eryngium* pertenecen a saponinas triterpenoides de oleano polihidroxiladas (Wang et al., 2012). Se aisló e identificó un total de 8 triterpenoides a partir de los hidrolizados ácidos y alcalinos de *Eryngium*. Todos pertenecen a triterpenoides pentacíclicos, que se clasifican en dos series, olean-12-eno y lupino (Wang et al., 2012). Se aislaron 4 derivados de perhidronaftalina sustituidos con un n-propilo de los extractos de hexano/éter de las partes aéreas de *E. creticum* (Ayoub et al., 2003) y los extractos etéreos de las semillas de *E. giganteum* (Muckensturm et al., 2010). Se identificaron 3 glucósidos monoterpenos del tipo ciclohexanona y 7 aldehídos-ésteres monoterpenos de siete especies de *Eryngium* (Wang et al., 2012). Los flavonoides también son uno de los componentes principales del género *Eryngium*. Se aisló e identificó un total de 15 flavonoides, incluidos flavonoles y flavononas de especies de *Eryngium*. Los glucósidos de quercetina y kaempferol con una cadena de oligosacáridos en C-3 o C-7, o dos cadenas de oligosacáridos en C-3 y C-7 son tipos de glucósidos de flavonol (Suleiman et al., 1994). También, se encontraron cumarinas simples y furanocumarinas lineales de especies de *Eryngium* (Wang et al., 2012). Once esteroides se han identificado de las especies de *Eryngium*, a partir de extractos hexánicos (García et al., 1999, Wolfe et al., 2000). Finalmente en las especies de *Eryngium* también se han identificado varios poliacetilenos (Ayoub et al., 2006; Joergen et al., 1992; Drake y Lam, 1972).

Actualmente, hay un aumento de interés en la fitoquímica como nuevas fuentes de antioxidantes naturales. En varias pruebas de actividad antioxidante *in vitro*, muchas especies de *Eryngium* demostraron tener actividad antioxidante (Ebrahimzadeh et al., 2010; Vit et al., 2008; Khaled et al., 2007; Truong et al., 2007; Dall'Acqua et al., 2007; Wong et al., 2006; Chanwitheesuk et al., 2005). Se demostró que las raíces de *E. alpinum* tiene una actividad altamente antioxidante hacia el radical DPPH o en relación a la actividad del ácido ascórbico. Los resultados son consistentes con los informes publicados que indican que la posición y el número de grupos glucosilo presentes en la molécula desempeñan un papel importante en la actividad antioxidante (Le Claire et al., 2005). Los extractos metanólicos de las hojas y la inflorescencia de *E. caucasicum* en la etapa de floración, se investigó por sus propiedades antioxidantes en donde se emplearon seis sistemas de ensayos *in vitro* (Nabavi et al., 2008).

Una investigación indicó que una decocción acuosa de *E. creticum* causó reducciones significativas en la concentración de glucosa en sangre cuando se administró por vía oral en ratas normoglucémicas e hiperglucémicas inducidas por STZ (Jaghabir et al., 1991). Los extractos acuosos de *E. creticum* exhibieron actividades antihiperglucémicas agudas sustanciales en ratas tratadas con almidón, a pesar de carecer de una eficacia *in vitro* favorable (Violet et al., 2011).

1.9.7 *Eryngium carlinae* F. Delaroche



Figura 1. Planta de *Eryngium carlinae*

Eryngium carlinae (figura 1) es una planta espinosa sin tallo aparente, y cuando raramente está, es inclinado a erecto, uno o varios, sencillos o con ramificaciones, puede crecer de 5 a 50 cm. La inflorescencia está compuesta de cabezuelas ovoides, de 5-10 mm de largo y de 5-7 mm de diámetro, son azules, violetas o blancas. Tiene flores pequeñas, con simetría radial, hermafroditas, de color blanco, azul o morado; cáliz con tubo obcónico, 5 lóbulos rígidos, acuminados, recorridos por un nervio grueso. Comúnmente es conocida como hierba del sapo o cabezona (CONABIO, 2009).

Se encuentra principalmente en lugares perturbados; sitios abiertos de las orillas de parcelas, alrededores de casas, en áreas degradadas. Es endémica en México y Centroamérica. Es una especie común en México hasta los 3900 msnm. En la herbolaria tradicional se le atribuyen propiedades diuréticas y cicatrizantes, sus hojas tiernas y su raíz pueden consumirse en ensaladas. En la actualidad se toma como agua de uso diario para reducir el colesterol y regular la presión arterial (CONABIO, 2009).

En una investigación realizada en nuestro grupo de trabajo por Noriega-Cisneros et al. (2012), el extracto etanólico de la parte aérea de *E. carlinae* en ratas Wistar diabéticas, mostró tener un efecto hipolipemiante, donde disminuyó significativamente los niveles de colesterol total y triglicéridos.

En otra investigación en nuestro grupo de trabajo realizada por Peña-Montes et al. (2019), en donde se obtuvo el extracto hexánico de las inflorescencias de *E. carlinae*. El extracto se administró en dos dosis diferentes (3 y 30 mg/Kg de peso corporal) a ratas Wistar inducidas a diabetes, y mostró tener un efecto protector sobre el daño oxidativo inducido por la diabetes en el cerebro, hígado y riñones, sobre todo a la dosis de 30 mg/Kg de peso corporal. Además, en este trabajo se identificaron varios compuestos, mayoritariamente (Z)-beta-farneseno (38.79%).

También, en otro trabajo de nuestro grupo, el extracto hexánico de las inflorescencias mostró tener un efecto hipoglucemiante en ratas Wistar diabéticas, además de un efecto

antioxidante y disminución del nivel de triglicéridos. La dosis utilizada fue de 30 mg/Kg de peso corporal (García-Cerrillo et al., 2018).

El extracto hidroalcohólico de la parte aérea de *E.carlinae* se probó en ratones macho CD1, y también disminuyó los niveles de colesterol total, así como incrementar el nivel de HDL-c. Además, se encontró que el efecto hipolipemiente pudiera deberse a un aumento en la expresión de los transportadores intestinales ABCG5/ABCG8, que regulan la absorción de esteroides y promueven la excreción de esteroides biliares en humanos (Castro-Torres et al., 2017).

1.10 Síntesis de nanopartículas y su uso en la terapéutica moderna

Una nanopartícula se define como una partícula que posee las tres dimensiones entre 1 a 100 nm de tamaño y están formadas por carbono, metales, óxidos metálicos o materia orgánica. Las nanopartículas exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas únicas a nanoescala, en comparación con sus partículas respectivas a escalas más grandes. Las nanopartículas son de diferente forma, tamaño y estructura. Pueden ser esféricas, cilíndricas, tubulares, cónicas, de núcleo hueco, espirales, planas o irregulares (Ealias y Saravanakumar, 2017).

Las nanopartículas generalmente se clasifican en orgánicas, inorgánicas y a base de carbono. Los dendrímeros, micelas, liposomas y ferritina, etc., son comúnmente conocidos como las nanopartículas orgánicas. Estas nanopartículas por sus características únicas las convierte en una opción ideal para la administración de medicamentos. La capacidad de carga del fármaco, su estabilidad y los sistemas de suministro, ya sea del fármaco dentro de la estructura o atrapado en la estructura. Las nanopartículas inorgánicas, se subdividen en nanopartículas a base de metales (los más usados son aluminio, oro, plata, cobre, cadmio, cobalto, hierro, plomo y zinc), y a base de óxidos metálicos. Mientras las nanopartículas a base de carbono se clasifican en fullerenos, grafeno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono y carbono negro (Ealias y Saravanakumar, 2017).

Las nanopartículas se sintetizan mediante varios métodos que se clasifican en top-down (de arriba hacia abajo) o bottom-up (de abajo hacia arriba). El método top-down o destructivo, es la reducción de un material a granel a partículas a escala nanométrica. La molienda mecánica, nanolitografía, ablación láser, pulverización catódica y la descomposición térmica, son algunos de los métodos de síntesis de nanopartículas más utilizados. El método bottom-up o constructivo, es la acumulación de material desde el átomo hasta las nanopartículas. Sol-gel, deposición química de vapor, pirolisis y biosíntesis son los métodos bottom-up más utilizados para la producción de nanopartículas (Ealias y Saravanakumar, 2017).

Con el desarrollo de la nanotecnología y los nanomateriales, se han realizado enormes progresos en los sistemas de descarga de nano-medicamentos. Existe evidencia consistente y sustancial de la eficacia de los materiales a nanoescala en la descarga de medicamentos, terapia de cáncer y descarga de medicamentos en sitios específicos (Rieux et al., 2013; Yun et al., 2013; Dai et al., 2016; Date et al., 2016; Yao et al., 2017). Varios de estos han sido

aprobados para uso clínico (p.e., Abraxane, Doxil, Genexol-PM). Los sistemas de descarga de nano-medicamentos, colectivamente llamados nanopartículas, pueden encapsular medicamentos, agentes de imagen, proteínas y genes. Las nanopartículas pueden proveer la solubilidad y la estabilidad de sus cargos encapsulados, y transferirlos a través de barreras biológicas como el tracto intestinal o la barrera hematoencefálica (Kou et al., 2018).

La carga de medicamentos en nanopartículas administrados por vía oral puede mejorar la estabilidad de los medicamentos, protegiéndolos contra la degradación química y/o enzimática en el tracto gastrointestinal. Las nanopartículas también aumentan el contacto con el epitelio gastrointestinal, lo que aumenta el tiempo de residencia, la absorción del fármaco y la biodisponibilidad (Souto et al., 2019). Los medicamentos pueden quedar atrapados dentro de la matriz de las nanopartículas o unidas a su superficie, y deben liberarse cerca del sitio de absorción. Las nanopartículas también deben demostrar un tiempo de circulación prolongado y un mayor TRP (Lin et al., 2017).

1.10.1 Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis verde es un método de síntesis bottom-up. Debido a que la síntesis convencional de nanopartículas puede involucrar procesos químicos y físicos costosos que a menudo usan materiales tóxicos con riesgos potenciales como toxicidad ambiental, citotoxicidad y carcinogenicidad (Ai et al., 2011). En años recientes, la síntesis biológica ha emergido como una alternativa atractiva a los métodos de síntesis tradicional para producir nanopartículas. La biosíntesis involucra el uso de un enfoque ecológico basado en la química verde que emplea entidades biológicas unicelulares y multicelulares como actinomicetos, bacterias, hongos, plantas y levaduras (Shah et al., 2015).

La comparación de las entidades biológicas mencionadas anteriormente y su potencial para convertirse en fábricas biológicas eficientes, sintetizando nanopartículas a través de plantas, es un enfoque relativamente sencillo y ventajoso. En comparación con los microorganismos, el enfoque sobre las plantas es más ventajoso ya que no necesita ningún procedimiento especial, complejo y de múltiples pasos, como el aislamiento, la preparación del cultivo y el mantenimiento del cultivo (Iravani, 2011; Thakkar et al., 2010). Además, la síntesis en plantas tiende a ser más rápida que en los microorganismos, es más rentable y es relativamente fácil de ampliar para la producción de grandes cantidades de nanopartículas (Swami et al., 2004; Jha et al., 2009). También, se ha demostrado que las combinaciones de moléculas que se encuentran en los extractos de plantas, actúan tanto como agentes reductores y como estabilizadores (Singh et al., 2010; Narayanan y Sakthivel, 2008).

Desde hace tiempo, se sabe que las plantas tienen el potencial de hiperacumular y reducir biológicamente los iones metálicos (Kulkarni y Muddapur, 2014; Kale et al., 2013). Debido a estas propiedades interesantes, las plantas se han considerado una ruta más amigable con el medio ambiente para sintetizar biológicamente nanopartículas metálicas. Se cree que los extractos de plantas que contienen alcaloides bioactivos, ácidos fenólicos, polifenoles, proteínas, azúcares y terpenoides tienen un papel importante en la reducción de los iones metálicos y luego en la estabilización (Castro et al., 2011; Marshall et al., 2007).

Es importante destacar que la síntesis de nanopartículas a partir de la reducción de sales metálicas a través de plantas es un proceso relativamente sencillo a temperatura ambiente. El proceso comienza mezclando una muestra de extracto de planta con una solución de sal metálica. La reducción bioquímica de las sales comienza inmediatamente y la formación de nanopartículas está indicado por un cambio de color de la mezcla de reacción (Shah et al., 2015). Durante la síntesis hay un periodo de activación inicial cuando los iones metálicos en el proceso se convierten de sus estados de oxidación mono o divalentes, a estados de valencia cero y se produce la nucleación de los átomos metálicos reducidos (Malik et al., 2014). Esto es seguido inmediatamente por un periodo de crecimiento cuando las nanopartículas vecinas más pequeñas se amalgaman para formar nanopartículas más grandes que son termodinámicamente más estables, mientras se produce una mayor reducción biológica de los iones metálicos. A medida que el crecimiento progresa, las nanopartículas se agregan para formar una variedad de morfologías como cubos, esferas, triángulos, hexágonos, pentágonos, varillas y alambres (Akhtar et al., 2013). En la etapa final de síntesis, la capacidad de los extractos de plantas para estabilizar la nanopartícula determina, en última instancia, su morfología más favorable y estable desde el punto de vista energético (Mittal et al., 2013; Dwivedi y Gopal, 2010).

Recientemente, se ha informado, con éxito, la biosíntesis de partículas, cables, flores y tubos de tamaño nanométrico. Estos nanomateriales biológicos sintetizados tienen aplicaciones potenciales en diferentes áreas como tratamiento diagnóstico, desarrollo de dispositivos quirúrgicos y fabricación de productos comerciales. La nanomedicina tiene un gran impacto en el sector de la salud en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas. Por lo tanto, la síntesis verde de nanopartículas se considera un componente básico de las próximas generaciones para controlar diversas enfermedades. Muchos informes anteriores demuestran que las nanopartículas biosintetizadas controlan eficazmente los cambios relacionados con el estrés oxidativo, la genotoxicidad y la apoptosis. Además, las nanopartículas tienen una aplicación en la industria agrícola y la ciencia de las plantas.

Tabla 3. Nanopartículas de síntesis verde con aplicaciones farmacológicas

Planta	Nanopartícula	Parte de la planta	Metabolitos de la planta involucrados en la biorreducción	Aplicaciones farmacológicas	Referencia
<i>Aloe vera</i>	In ₂ O ₃	Hojas	Biomoléculas	Propiedades ópticas	Maensiri et al. (2008)
<i>Alternanthera sessilis</i>	Ag	Toda la planta	Grupos amino y carboxilo	Antioxidante, antimicrobiano	Nairaimathi et al. (2012)
<i>Cassia fistula</i>	Au	Corteza	Grupos hidroxilo	Antihiperglicémico	Daisy y Saipriya (2012)
<i>Citrullus colocynthis</i>	Ag	Calli	Polifenoles	Antioxidante, anticancerígeno	Satyavani et al. (2011)
<i>Mirabilis jalapa</i>	Au	Flores	Polisacáridos	Antimicrobiano	Vankar y Bajpai (2010)

<i>Polygala tenuifolia</i>	ZnO	Raíces	No mencionados	Antioxidante, antiinflamatorio	Nagajyothi et al. (2015)
<i>Tinospora cordifolia</i>	Ag	Hojas	Compuestos fenólicos	Antilarvica	Jayaseelan et al. (2011)
<i>Trigonella-foenum graecum</i>	Au	Semillas	Flavonoides	Catalítico	Aromal y Philip (2012)

1.10.2 Nanopartículas de plata de síntesis verde

La síntesis verde de nanopartículas metálicas es una de las áreas más cambiantes y, al mismo tiempo de las más inspiradoras de la investigación debido al hecho que los nanomateriales a base de metales tienen importantes aplicaciones en la industria, medicina, el medio ambiente, y la agricultura. Particularmente, la síntesis verde de AgNP es probablemente la más ampliamente documentada en la nanotecnología verde. Los organismos de virtualmente todos los reinos, son potenciales biofábricas o biofuentes de moléculas usadas en la producción de AgNP, principalmente a partir de metabolitos primarios y secundarios presentes en los extractos vegetales (Silva et al., 2019).

Se han realizado numerosas investigaciones a las AgNP para observar su potencial como antioxidante e hipoglucemiante. Por ejemplo, en una investigación realizada por Moldovan et al. (2016), las AgNP sintetizadas a partir del extracto acuoso de *Sambucus nigra*, mostraron tener efectos antioxidantes en ratas Wistar inducidas a estrés oxidativo por carragenano. Shanker et al. (2017), sintetizaron AgNP a partir del extracto acuoso del fruto de *Momordica charantia*, y mostraron tener un efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas. Balan et al. (2015), mostraron que las AgNP sintetizadas a partir de extracto acuoso de las hojas de *Lonicera japonica* tuvieron un efecto antioxidante, y además, mostraron tener inhibición sobre las α -glucosidasas, por lo que podrían ser un tratamiento coadyuvante en pacientes con DM.

Además, Afifi y Abdelazim (2015), usando solo AgNP de síntesis tradicional, mostraron tener una disminución del estrés oxidativo y aumento en la expresión de enzimas antioxidantes en ratas diabéticas. Alkaladi et al. (2014), también con AgNP de síntesis tradicional, mostraron un incremento de la expresión y nivel de insulina, incrementan la actividad de la hexocinasa, y mostraron mejoría en los niveles y expresión de los transportadores de glucosa GLUT2 y receptores asociados a insulina.

Con estos datos, se puede pensar que el uso de AgNP de síntesis verde, puede ser un tratamiento muy efectivo contra el estrés oxidativo y los niveles de glucosa elevados producidos por la DM. Además, al llevar cargados los metabolitos secundarios del extracto de *Eryngium carlinae*, que también han mostrado tener efectos benéficos ante el estrés oxidativo, los niveles elevados de lípidos y los niveles de glucosa elevados producidos por la DM, se espera que un sinergismo de estos componentes ofrezca una mayor protección ante las complicaciones y el estrés oxidativo en la DM.

2. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y puede generar diversas complicaciones que impactan en la calidad de vida de la población, además, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno que exacerbaban las complicaciones, por lo cual se busca tener tratamientos efectivos para disminuir las complicaciones asociadas a esta enfermedad. Una alternativa es el uso de extractos de plantas medicinales como *Eryngium carlinae*, y al combinar los componentes del extracto con nanopartículas, que ya han mostrado mejorar la absorción y biodisponibilidad de fármacos, se podría obtener un tratamiento alternativo eficaz.

3. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de *Eryngium carlinae* y su combinación con nanopartículas de plata disminuyen el daño oxidativo producido por la diabetes en el cerebro de ratas con diabetes experimental.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar la capacidad antioxidante e hipoglucémica de los componentes del extracto acuoso de *Eryngium carlinae* y su combinación con las nanopartículas de plata de síntesis verde obtenidas a partir del extracto en el cerebro de ratas con diabetes experimental.

4.2 Objetivos específicos

- Dilucidar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de *Eryngium carlinae*.
- Sintetizar nanopartículas de plata usando la técnica de síntesis verde a partir del extracto acuoso de *Eryngium carlinae*.
- Medir el efecto hipoglucémico e hipolipidémico del extracto acuoso de *Eryngium carlinae* y su combinación con las nanopartículas de plata de síntesis verde en suero de ratas diabéticas.
- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *Eryngium carlinae* y su combinación con las nanopartículas de plata de síntesis verde sobre la función mitocondrial en cerebro de ratas diabéticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material vegetal

La parte aérea de la planta *Eryngium carlinae* se recolectó en la ciudad de Morelia, Michoacán en la ubicación 137°SE19°38'2''N101°16'14''O, a un costado de la carretera Federal 14-Morelia-Uruapan, Km 11 en la época de otoño. La identificación de la planta fue realizada por el D.C. Francisco Alfredo Saavedra Molina, profesor e investigador titular del laboratorio de bioquímica del instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Posterior a la recolección, las plantas se trasladaron al laboratorio de bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, se secaron y pulverizaron. Posteriormente, se almacenaron protegidas de la luz solar a temperatura ambiente hasta su uso.

5.1.2 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de entre 280-360 g. Las ratas fueron trasladadas al bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico a temperatura controlada con un ciclo de luz/obscuridad de 12 h, fueron alimentadas con alimento estándar para roedores y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999 de las Regulaciones Federales Mexicanas para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio.

5.1.3 Protocolo experimental

Un total de 36 ratas Wistar macho con un peso entre 280 y 360 g, se dividieron aleatoriamente en seis grupos con seis ratas cada grupo. Grupo 1, ratas control (vehículo, agua desionizada). Grupo 2, ratas diabéticas (vehículo, agua desionizada). Grupo 3, RN+EC (ratas normoglucémicas administradas con 30 mg/Kg EC). Grupo 4, RD+EC (ratas diabéticas administradas con 30 mg/Kg EC). Grupo 5, RN+AgNP (ratas normoglucémicas administradas con 30 mg/Kg AgNP). Grupo 6, RD+AgNP (ratas diabéticas administradas con 30 mg/Kg AgNP). Tanto el vehículo, el extracto y las nanopartículas, fueron administradas diariamente durante 45 días por vía oral usando una sonda orogástrica.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación del extracto

El extracto acuoso de la planta fue preparado mediante el método descrito por Villalpando y Rosas (2019) con ligeras modificaciones. Se añadieron 3 g de la planta *Eryngium carlinae* pulverizada por cada 100 mL de agua desionizada (30 mg/mL), posteriormente, la mezcla se calentó a una temperatura de 85 °C con agitación constante durante 45 min. Inmediatamente después del tiempo de calentamiento, el extracto se filtró

utilizando un papel filtro Watmann No. 1. El extracto acuoso se almacenó a una temperatura de 5 °C en la oscuridad hasta su uso.

5.2.2 Síntesis y caracterización de AgNP

La síntesis y caracterización de AgNP se realizó utilizando el método de Villalpando et al. (2020) con modificaciones. Se preparó una solución de AgNO₃ 10 mM; posteriormente, 5 mL de esta solución se hizo reaccionar con 5 mL del extracto acuoso de *Eryngium carlinae* (30 mg/mL). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación constante durante 30 minutos y a un pH de 4.5. Durante el transcurso de la reacción se observó un cambio de coloración a un color rojizo-marrón que es característico de la formación de AgNP. La confirmación de la síntesis de AgNP fue realizada con la técnica UV-Vis usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda, con un espectro de emisión entre 420-440 nm, característico de las AgNP. Además, se realizó una microscopia electrónica de barrido con un microscopio Jeol JSM-7600F.

5.2.3 Análisis fitoquímico del extracto

Se realizaron diferentes pruebas para cuantificar la presencia o ausencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios, así como su cuantificación. Para realizar las determinaciones, se prepararon diluciones del extracto a 1 mg/mL para las determinaciones de fenoles y flavonoides totales, y 10 mg/mL para la determinación de terpenoides totales.

5.2.3.1 Cuantificación de fenoles totales

La presencia y cuantificación de fenoles totales se midió como se describió previamente (Kim et al., 2003). Se tomaron 10 µL del extracto a una concentración de 1 mg/mL y se hizo reaccionar con 750 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% durante 5 min y con agitación; posteriormente, se agregaron 750 µL de Na₂CO₃ al 6% y se mezcló durante 1 min; posteriormente, se incubó durante 1 h en la oscuridad, y posteriormente, se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. La cantidad de fenoles totales se cuantificó a partir de una curva estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones (0 a 1 µmoles), y los resultados obtenidos se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/mL de extracto. El experimento se realizó por quintuplicado.

5.2.3.2 Cuantificación de flavonoides totales

La presencia y cuantificación de flavonoides totales se midió como se reportó previamente (Schwarz et al., 2001). Se tomaron 10 µL del extracto a una concentración de 1 mg/mL; posteriormente, se agregaron 490 µL de MeOH y se mezcló durante 1 min; posteriormente, se agregó 1 mL de MeOH, 100 µL de AlCl₃ y 100 µL de CH₃O₂K y se mezcló durante 1 min; posteriormente, se incubó durante 1 h en la oscuridad y se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. La cantidad de flavonoides totales se cuantificó a partir de una curva estándar con quercetina a diferentes

concentraciones (0-100 μ moles), y los resultados obtenidos se reportaron como mg de equivalentes de quercetina (EQ)/mL de extracto. El experimento se realizó por quintuplicado.

5.2.3.3 Cuantificación de terpenoides totales

La presencia y cuantificación de terpenoides totales se midió como se reportó previamente (Ghorai et al., 2012). Se tomaron 250 μ L del extracto a una concentración de 10 mg/mL; posteriormente, se le agregaron 2.5 mL de cloroformo y se agitó durante 3 min, luego se dejaron reposar los tubos durante 10 min en un baño de hielo; posteriormente, se le agregaron 100 μ L de H₂SO₄ y se dejaron reposar durante 1.5 h en la oscuridad, luego con una micropipeta se tomaron 100 μ L. La fase rojiza que se formó en el fondo del tubo se colocó en una celda con 900 μ L de MeOH y se leyó la absorbancia a 538 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. La concentración de terpenoides totales se cuantificó a partir de una curva estándar con linalol a diferentes concentraciones (0-30 mg/mL), y los resultados se reportaron como mg de equivalentes de linalol (EL)/mL de extracto. El experimento se realizó por triplicado.

5.2.4 Determinación de la actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total tanto del extracto como de la combinación extracto-AgNP, fue determinada de acuerdo al procedimiento descrito por Prieto et al. (1999). 100 μ L de ácido ascórbico (0.3 mg/mL; control), extracto y/o combinación extracto-AgNP a diferentes concentraciones (0.3, 1.0, 10 y 30 mg/mL) se mezclaron con 200 μ L de agua desionizada y 3 mL de solución reactiva (H₂SO₄ 0.6 M, fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4mM) y se agitaron. Después, la mezcla de reacción se incubó en un baño María durante 90 min, después se enfrió y se midió la absorbancia a 695 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. La actividad inhibitoria se calculó con un control negativo.

5.2.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH[•]

La actividad antioxidante tanto del extracto como de la combinación extracto-AgNP se determinó en base a la capacidad de eliminar el radical libre DPPH[•] en base al método de Blois (1958). Se prepararon diluciones del extracto y la combinación extracto-AgNP 0.3, 1.0, 10 y 30 mg/mL. 100 μ L extracto y/o combinación extracto-AgNP se mezclaron con 900 μ L de agua desionizada y 5000 μ L de DPPH 0.2 mM, se agitaron y se incubaron durante 30 min en la oscuridad. La absorbancia se midió a 517 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. Las diferencias en la absorbancia entre las muestras y el control fueron calculadas y expresadas como porcentaje de eliminación del radical DPPH[•]. Se utilizó una solución de ácido ascórbico 0.3 mg/mL como control positivo.

5.2.6 Inducción de diabetes

Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 12 h. Posteriormente, a cada rata se le administró STZ a una dosis de 45 mg/Kg de peso corporal disuelta en buffer de citrato 0.1 M a un pH de 4.5 por vía intraperitoneal. Dos semanas después de la inyección con STZ, se determinaron los niveles de glucosa en sangre tras un ayuno de 12 h, con un glucómetro

Accu-Check Performa (Roche) para confirmar la diabetes. Solo las ratas con un nivel de glucosa ≥ 300 mg/dL se consideraron para los experimentos (las ratas control y normoglucémicas fueron tratadas de la misma forma, inyectados únicamente con buffer de citrato por vía intraperitoneal). Todos los tratamientos se iniciaron 2 semanas después de la inyección con STZ o el vehículo.

5.2.7 Efecto de la administración de *E. carlinae* y las AgNP sobre los niveles de glucosa y el peso corporal

Para las mediciones de glucosa y peso corporal, las ratas fueron sometidas a un periodo de ayuno de 12 h antes de las mediciones. La primera medición se realizó al inicio del tratamiento a todos los grupos y posteriormente, se realizaron cada 7 días durante los 45 días de duración del tratamiento. Los niveles de glucosa se determinaron mediante un glucómetro Accu-Check Performa (Roche) y una gota de sangre de las ratas, obtenida por una punción en la porción final de la cola.

5.2.8 Obtención de muestras para medir los parámetros bioquímicos y la actividad antioxidante

Una vez transcurridos los 45 días de tratamiento, las ratas fueron sometidas a un periodo de ayuno de 12 h, para posteriormente, sacrificarlas por decapitación. La sangre se recolectó en un tubo rojo BD Vacutainer, inmediatamente después se extrajo el cerebro lo más rápido posible con la ayuda de tijeras quirúrgicas y se pesaron. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min para obtener el suero para las mediciones de los parámetros bioquímicos.

5.2.9 Aislamiento de mitocondrias de cerebro

Las mitocondrias de cerebro se aislaron por el método de Sims modificado (1990). Una vez extraído el cerebro, se colocó en un vaso de precipitados (dentro de una cubeta con hielo), con medio de aislamiento de mitocondrias de cerebro (sacarosa 70 mM, manitol 210 mM, EGTA 1 mM, albúmina 0.5%, MOPS 10 mM, a pH de 7.4 [Thakar y Hassan, 1988]); posteriormente, el cerebro se comenzó a cortar con tijeras quirúrgicas, se decantó y se volvió a agregar medio de aislamiento las veces que fueron necesarias para eliminar el exceso de sangre. El tejido se pasó a un tubo Potter-Elvehjem para homogeneizarlo con la ayuda de un vástago con punta de teflón, hasta que quedó completamente homogéneo y teniendo cuidado de que no se formaran burbujas en el tubo. El homogeneizado se pasó a un tubo de plástico para centrifuga previamente enfriado y se centrifugó a 2180 rpm a 4 °C durante 10 min en una centrifuga Beckman J2-MC. Se decantó el sobrenadante en otro tubo para centrifuga de plástico enfriado previamente y se centrifugó a 10350 rpm a 4 °C por 10 min en una centrifuga Beckman J2-MC. Antes de centrifugar el sobrenadante, se tomaron 1.5 mL para las mediciones en el homogenado. Una vez que se terminó de centrifugar se desechó el sobrenadante y el pellet que se formó en el fondo del tubo que corresponde a las mitocondrias aisladas se resuspendieron suavemente en 750 μ L de medio de aislamiento con un pincel de punta fina. Las muestras tanto del homogenado como las mitocondrias aisladas se colocaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a -60 °C hasta su uso.

5.2.10 Determinación de parámetros bioquímicos

5.2.10.1 Determinación de glucosa sérica

La determinación de los niveles de glucosa sérica se realizó por el método de oxidación enzimática de la glucosa a través de la reacción de Barham y Trinder (1972), en donde se forma un producto coloreado, y cuya intensidad de la coloración es directamente proporcional a los niveles de glucosa sérica.

5.2.10.2 Determinación de colesterol total

La determinación de colesterol total en suero se realizó mediante la técnica propuesta por Deeg y Ziegenhorn (1983), mediante una reacción de hidrólisis y oxidación del colesterol, para obtener un compuesto coloreado, y la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de colesterol presente en la muestra.

5.2.10.3 Determinación de triacilglicéridos

La determinación de TAG se realizó por el método propuesto por Cole et al. (1977). El método se basa en una reacción colorimétrica enzimática, utilizando glicerol-3-fosfato oxidasa, donde la presencia de TAG en la muestra origina un compuesto de color rojo, y la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de TAG en la muestra.

5.2.11 Determinación de la producción de ERO

La producción de ERO se determinó con la prueba de fluorescencia del H₂DCFDA. 0.5 mg/mL de proteína mitocondrial se resuspendieron en un buffer con 10 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, y 3 mM de KH₂PO₄, a pH de 7.4, se incubaron con 12.5 μM de H₂DCFDA durante 15 min en un baño de hielo con agitación (Ortiz-Ávila et al., 2013). La fluorescencia basal fue registrada durante 1 min y luego se adicionaron 5 mM de glutamato + malato y el incremento de la fluorescencia se monitoreó durante 20 min. Los cambios en la fluorescencia fueron registrados a longitudes de onda de Ex/Em de 485/520 nm en un Espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-5301PC.

5.2.12 Determinación de la peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se midió de acuerdo al método reportado previamente por Buege y Aust (1978). 0.8 mg de mitocondrias aisladas y previamente lavadas se resuspendieron en 1 mL de buffer PBS 0.1 M (pH 7.4) en un tubo Falcon de 15 mL; posteriormente, se añadieron 10 μL de BHT al 3% y se agitó; posteriormente, se agregaron 2 mL de la solución reactiva (ácido tricloroacético 15% , TBA 0.375%, y HCl 0.25 M), y se homogenizaron en 3 ciclos vórtex/hielo; posteriormente, fueron incubados durante 30 min en baño María; posteriormente, las mezclas de reacción se atemperaron durante 10 min, y luego, se centrifugaron a 7500 rpm durante 5 min; finalmente, se tomó 1 mL del sobrenadante y se colocó en una celda evitando la formación de burbujas, y se determinó su absorbancia a 532 nm con un slit de 1nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Para determinar los niveles de peroxidación de lípidos se usó la ecuación de Beer-Lambert $A=ECI$. Los resultados fueron expresados como nmoles de TBARS/mg de proteína, y calculado en

base a la absorbancia empleando el coeficiente de extinción molar del MDA de $1.56 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.2.13 Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa se analizó midiendo la conversión de peróxido de hidrógeno a oxígeno con un electrodo de oxígeno tipo Clark conectado a un monitor de oxígeno biológico (5300 Biological Oxygen Monitor, YSI, Ohio, USA), de acuerdo al método reportado previamente por Jeulin et al. (1989). 1 mg/mL de proteína de homogenado de tejido se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.4, a una temperatura de 25°C y se monitoreó durante 1 min. Después, se agregó H_2O_2 5 mM a la cámara, y la conversión de H_2O_2 a oxígeno en un lapso de 3 min fue cuantificada con el electrodo de oxígeno.

5.2.14 Determinación de la actividad de la Superóxido dismutasa mitocondrial

La actividad de la SODmt se determinó empleando un kit de análisis comercial (Sigma Aldrich, USA). 0.2 mg/mL de proteína mitocondrial se resuspendieron en 200 μL de buffer de trabajo WST y posteriormente, se adicionaron 20 μL de solución de trabajo enzimática; posteriormente, se incubaron durante 20 min a 37 °C con agitación suave y las lecturas se tomaron a 440 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los resultados de la actividad de la SODmt fueron expresados como unidades de SOD • mg de proteína y se calcularon utilizando como estándar SOD de *Escherichia coli*.

5.2.15. Determinación de la actividad de la Glutación peroxidasa

La actividad de la GPx se midió espectrofluorométricamente. 0.8 mg/mL de proteína mitocondrial se resuspendieron en cbp. 2 mL de buffer de fosfatos 50 mM + 5 mM de EDTA; posteriormente se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con 1 mM de GSH, 1 mM de NaN_3 , 0.1 mg de BSA y 100 U/mL de glutatión reductasa (GR), al cuarto minuto de incubación se adicionó NADPH 100 μM y se incubó el min restante; posteriormente, se midió la fluorescencia durante 30 s a una Ex/Em 352/464 nm; posteriormente se adicionaron 250 μM de H_2O_2 y se continua la lectura de fluorescencia por 3 min. Los resultados de la actividad de la GPx fueron expresados como U de GPx • mg de proteína, y se calcularon con una curva de NADPH a diferentes concentraciones (0-120 μMol).

5.2.16 Determinación de la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones

Para determinar la actividad de los complejos mitocondriales que integran la cadena transportadora de electrones, las mitocondrias de cerebro aisladas se permeabilizaron utilizando un método de congelación/descongelación. Brevemente, alícuotas de las muestras mitocondriales de cerebro fueron sometidas a 3 ciclos de congelación/descongelación de aproximadamente 1 h. El buffer de fosfatos utilizado para las mediciones en todos los complejos tenía una concentración de 250 mM y un pH 7.5.

5.2.16.1 NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)

La actividad de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I), se determinó espectrofluorométricamente. 0.2 mg/mL de proteína mitocondrial se resuspendieron en buffer de fosfatos y se incubaron durante 7 min con 1 μg de antimicina A y 1 mM de KCN en un volumen final de 1 mL. Luego se añadió 10 μM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ como aceptor de electrones y la fluorescencia basal fue registrada durante 1 min a una Ex/Em 340/464 nm, apertura de 5 nm y en modo de alta sensibilidad. Posteriormente, se añadieron 100 μM de NADH y su oxidación se registró durante 1 min; posteriormente, se agregó rotenona 10 μM y la fluorescencia se registró durante 2 min, finalmente, se añadieron 100 μM de NADH y se registró la lectura 2 min en un espectrofotómetro Shimadzu RF-5301 (Ortiz-Ávila et al., 2013).

5.2.16.2 Succinato: DCIP oxidorreductasa (complejo II)

0.2 mg de proteína mitocondrial se resuspendió en agua desionizada (volumen final de 800 μL) y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 μL de buffer de fosfatos, 20 μL de albúmina bovina (10 mg/mL), 5 mM de succinato, 10 μM de rotenona, 2.5 μM de antimicina y 1 mM de KCN y se incubaron durante 3 min. Después, se adicionó 80 μM de DCIP y su reducción se registró durante 2.5 min a 600 nm, finalmente, se agregaron 0.5 mM de TTFA y se terminó de registrar la absorbancia hasta 5 min a 600 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de 21 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del DCIP para calcular la actividad (modificado de Cortés-Rojo et al., 2009).

5.2.16.3 Succinato: citocromo *c* oxidorreductasa (complejo II + III)

Se resuspendieron 0.2 mg/mL de proteína mitocondrial en agua desionizada (volumen final de 800 μL) y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 μL de buffer de fosfatos, 0.1 mM de EDTA, 5 mM de succinato, 20 μL de albúmina bovina (10 mg/mL), 10 μM de rotenona y 1 mM de KCN y se incubaron durante 3 min. Después se adicionaron 250 μg de citocromo *c* oxidado y su reducción se registró durante 1.5 min a 550 nm, finalmente se agregó 2.5 μM de antimicina A y se terminó de registrar la absorbancia hasta 3 min a 550 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 18. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de 19.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del citocromo *c* para calcular la actividad (modificado de Cortés-Rojo et al., 2009).

5.2.16.4 Citocromo *c* oxidasa (complejo IV)

Se resuspendieron 0.2 mg/mL de proteína mitocondrial en agua desionizada (volumen final de 800 μL) y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 μL de buffer de fosfatos, 20 μL de albúmina bovina (10 mg/mL), 10 μM de rotenona, 0.5 mM de TTFA y 2.5 μM de antimicina A y se incubaron durante 3 min. Después, se adicionaron 125 μg de citocromo *c* reducido con ditionita de sodio y su oxidación se registró durante 24 s a 550 nm, finalmente, se agregó 1 mM de KCN y se terminó de registrar la absorbancia hasta 120 s. Se utilizó el coeficiente de extinción molar de 19.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ del citocromo *c* para calcular la actividad (modificado de Cortés-Rojo et al., 2009).

5.2.17 Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm E.E y fueron analizados utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías empleando el software GraphPad Prism 6.0. Para la caracterización de las AgNP se usó el software OriginPro 9.0.

6. RESULTADOS

6.1 Síntesis y caracterización de las AgNP

Para observar si el extracto acuoso de *E. carlinae* tenía la capacidad de reducir los iones plata presentes en una solución 10 mM de AgNO_3 y formar AgNP, ambos se hicieron reaccionar durante 15 min con agitación constante, y se observó un cambio de coloración en la mezcla de reacción, de un color marrón claro a un color marrón-rojizo característico de la síntesis de AgNP; a partir de los 2 min posteriores de iniciada la reacción, con lo que se sugirió la formación de AgNP (figura 2A). Posteriormente, para comprobar la formación de las AgNP se obtuvo el espectro de absorbancia tanto del extracto como de la mezcla de reacción, realizando un barrido de 200 a 900, al comparar ambos espectros, se observó un pico de absorbancia a 445 nm en la mezcla de reacción, el cual se encuentra dentro del rango característico de la excitación del plasmón superficial de las AgNP, mientras que en el espectro del extracto no se observó este pico, por lo que con esto se confirmó la síntesis de las AgNP (figura 2B).

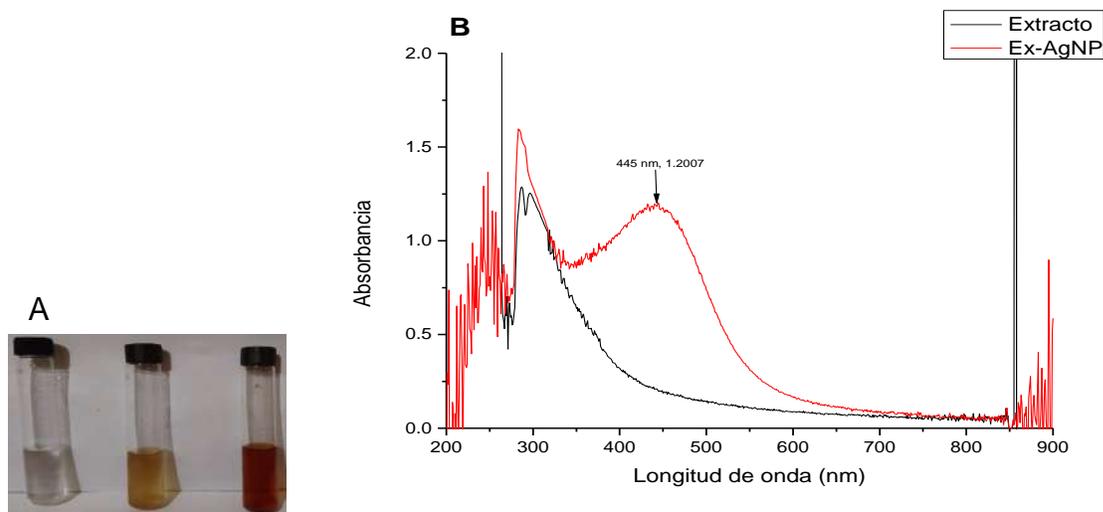


Figura 2. Síntesis y caracterización de las AgNP por la técnica UV-Vis. (A) Color de la solución de AgNO_3 (izquierda), extracto acuoso de *E. carlinae* (centro) y la mezcla de reacción de síntesis de AgNP (derecha). (B) Espectro de absorbancia UV-Vis del extracto (negro) y de las AgNP sintetizadas a partir del extracto (rojo).

La morfología y el tamaño de las AgNP se observó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) realizando un mapeo composicional. Se observó la presencia de plata elemental en forma de nanopartículas, y estas estructuras se observaron monodispersas, es

decir, con un tamaño similar entre todas las estructuras observadas (estructuras en color rojo), y su tamaño oscila entre los 10-30 nm (figura 3).

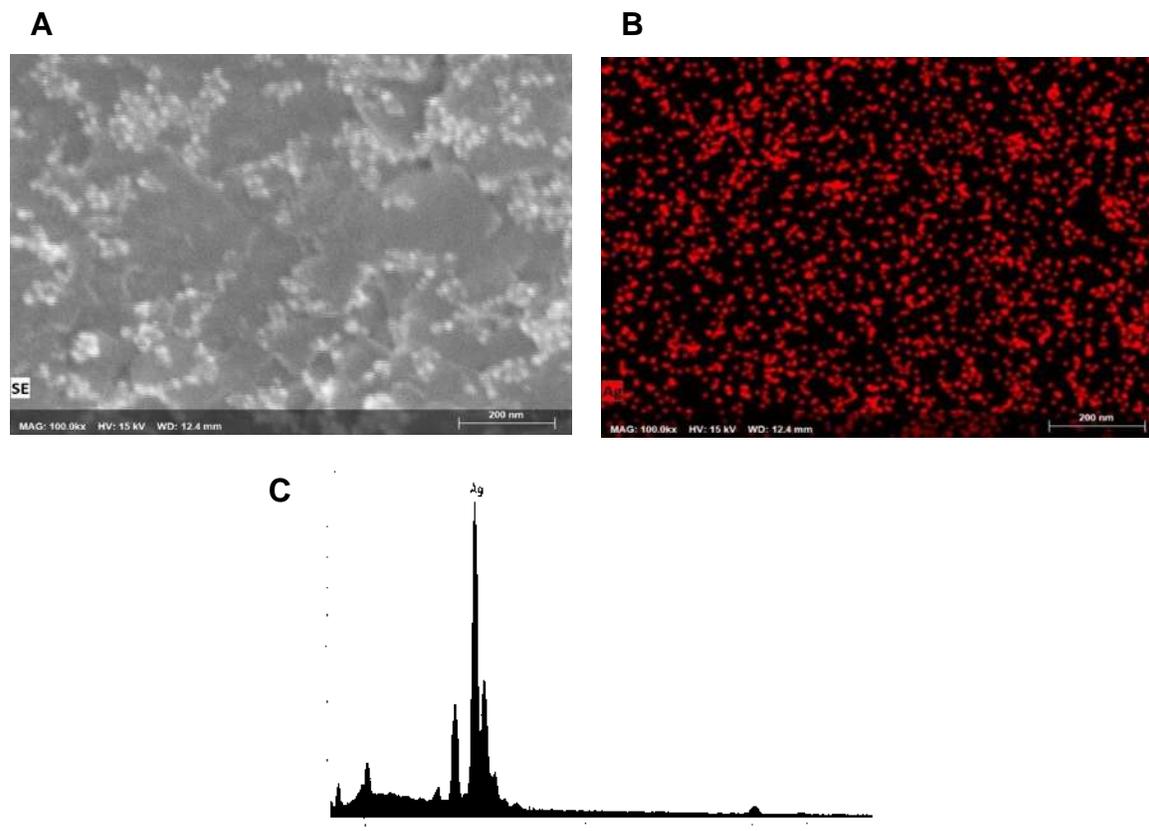


Figura 3. Análisis de MEB de las AgNP sintetizadas a partir del extracto. Micrografía de MEB (A,B) y análisis EDS de las AgNP (C).

6.2 Evaluación fitoquímica del extracto acuoso de *Eryngium carlinae*.

Se cuantificó la concentración de diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto (Tabla 4). Los resultados mostraron que en el extracto se encuentran presentes diferentes clases de metabolitos secundarios, y los metabolitos más abundantes son los flavonoides, con una concentración de 3.3032 ± 0.11 mg de EQ/mL, seguidos de los terpenoides (0.0424 ± 0.0028 mg de EL/mL) y fenoles (0.0038 ± 0.09 mg de EAG/mL).

Tabla 4. Concentración de fenoles totales en el extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP).

Prueba	Concentración
Fenoles totales (mg de EAG/mL)	0.0038 ± 0.09
Flavonoides totales (mg de EQ/mL)	3.3032 ± 0.11
Terpenoides totales (mg de EL/mL)	0.0424 ± 0.0028

Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes.

6.3 Actividad antioxidante *in vitro* del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP).

Se midió el efecto antioxidante *in vitro* de los dos tratamientos mediante los ensayos de actividad anti-DPPH y capacidad antioxidante total (figura 4A, 4B). En el ensayo de actividad anti-DPPH que se muestra en la figura 4A, tanto el extracto como la combinación extracto-AgNP mostraron una actividad significativamente menor ($p \leq 0.05$) a todas las concentraciones con respecto al control, y la actividad fue dependiente a la concentración, ya que tanto el extracto como la combinación extracto-AgNP mostraron la mayor actividad a la concentración más alta que se midió (30 mg/mL). Mientras en el ensayo de capacidad antioxidante total que se muestra en la figura 4B, el extracto y la combinación extracto-AgNP mostraron una capacidad antioxidante total significativamente menor ($p \leq 0.05$) con respecto al control, y la actividad fue dependiente a la concentración, ya que ambos tratamientos mostraron la mayor capacidad antioxidante total a la concentración más alta.

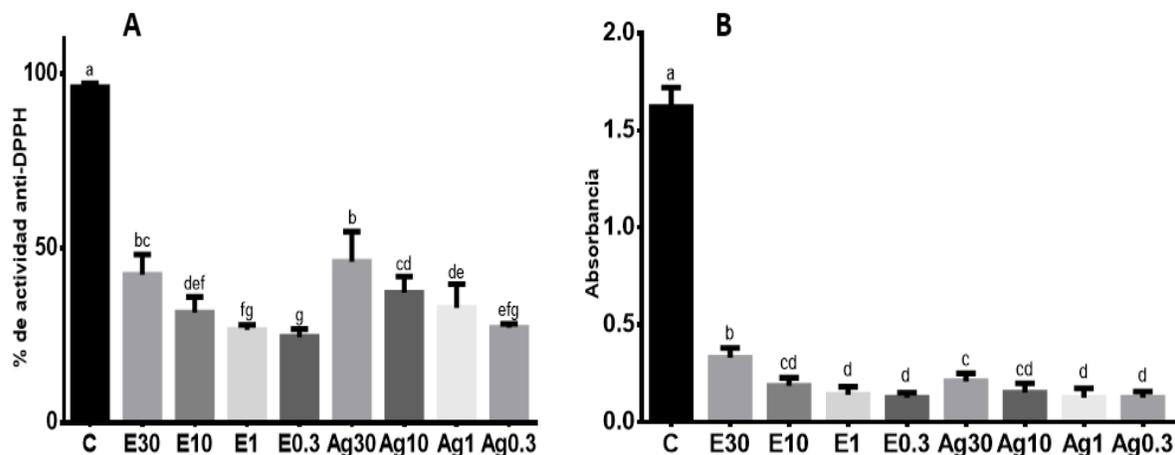


Figura 4. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto y la combinación extracto-AgNP. (A) Actividad anti-DPPH, (B) capacidad antioxidante total. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. ANOVA, Duncan, letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). C: control (ácido ascórbico 0.3 mg /mL); E30: extracto (30 mg/mL); E10: extracto (10 mg/mL); E1: extracto (1 mg/mL); E0.3: extracto (0.3 mg/mL); Ag30: extracto-AgNP (30mg/mL); Ag10: extracto-AgNP (10 mg/mL); Ag1: extracto-AgNP (1 mg/mL); Ag0.3: extracto-AgNP (0.3 mg/mL).

6.4 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre durante el periodo de tratamiento.

La glucosa en sangre y el peso corporal fueron monitoreados semanalmente durante los 45 días de tratamiento (figura 5A, 5B). El grupo diabético mostró un incremento significativo, 6.5 veces mayor de los niveles de glucosa ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo control, y este incremento se mantuvo durante el transcurso del tratamiento como se observa en la figura 5A, mientras que el grupo diabético administrado con el extracto no mostró diferencias significativas con respecto al grupo diabético, sin embargo, el grupo diabético administrado con la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) mostró una disminución significativa de los niveles de glucosa ($p \leq 0.05$) a partir del día 35 del tratamiento con respecto al grupo diabético y diabético administrado solo con extracto, y esta disminución se mantuvo hasta el final del tratamiento (figura 5A). Por otro lado, los grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (figura 5A). El grupo control mostró una ganancia significativa de peso corporal ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo diabético, así como con los grupos diabéticos administrados con el extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP), ya que todos los grupos diabéticos mostraron una disminución de peso corporal con el transcurso del tratamiento (figura 4B). Por otro lado, los grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (figura 5B).

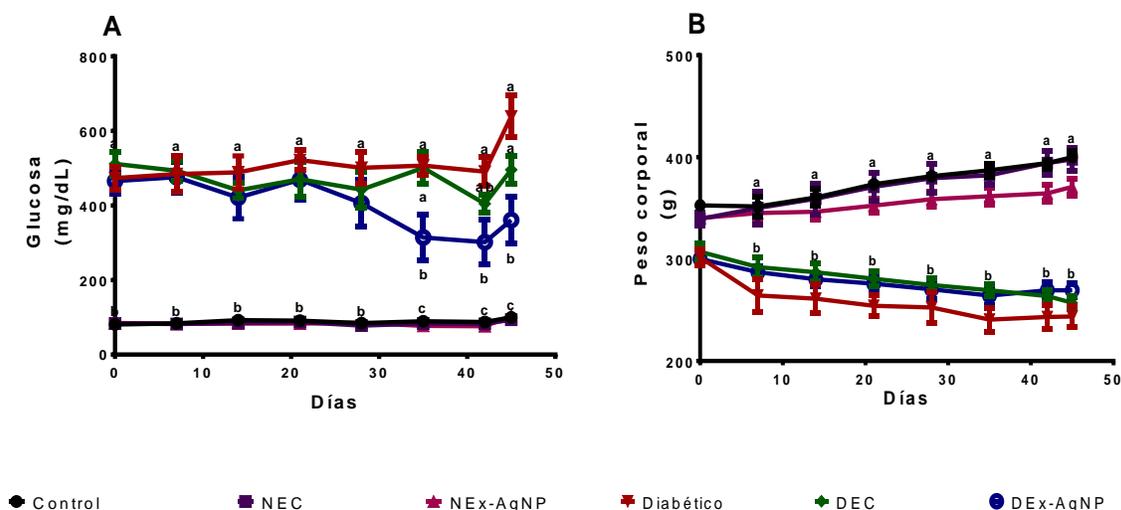


Figura 5. Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-AgNP en los niveles de glucosa y el peso corporal. (A) Niveles de glucosa, y (B) peso corporal durante el periodo de tratamiento. Los resultados se presentan como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$). NEC, normoglucémicas administradas con extracto; NExAgNP, normoglucémicas administradas con la combinación extracto-AgNP; DEC, diabéticas administradas con extracto; DExAgNP, diabéticas administradas con la combinación extracto-AgNP.

6.5 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre.

Una vez terminado el tratamiento se midieron los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre (Tabla 5). Al final del tratamiento el grupo diabético mostró un incremento significativo de los niveles de glucosa ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo control (tabla 5), mientras el grupo diabético administrado solo con el extracto no mostró diferencias significativas con respecto al grupo diabético, sin embargo, el grupo diabético administrado con la combinación extracto-AgNP mostró una disminución significativa de los niveles de glucosa con respecto al grupo diabético, sin embargo, este valor no igualó al del grupo control. Por otro lado, los grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostraron modificación en los niveles de glucosa con respecto al grupo control. En cuanto a los niveles de colesterol en sangre, los resultados no mostraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales (tabla 5). Mientras que los niveles de triglicéridos en sangre en el grupo diabético mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo control (tabla 5), mientras el grupo diabético administrado solo con el extracto no mostró diferencias significativas con respecto al grupo diabético, sin embargo, el grupo diabético administrado con la combinación extracto-AgNP mostró una disminución significativa de los niveles con respecto al grupo diabético, pero no mostró diferencias significativas con respecto al grupo diabético administrado solo con el extracto, pero además no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. Por otro lado, los grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostraron modificación en los niveles con respecto al grupo control.

Tabla 5. Efecto del extracto y la combinación extracto-AgNP en los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre.

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
Control	100 ± 3.33 ^c	70.666 ± 3.07	59.166 ± 3.50 ^c
NEC	93.5 ± 1.60 ^c	77.666 ± 2.20	61.666 ± 2.41 ^c
NExAgNP	103.5 ± 5.09 ^c	77.5 ± 4.62	60.833 ± 3.77 ^c
Diabético	639 ± 56.56 ^a	72.333 ± 8.24	151.166 ± 18.47 ^a
DEC	495.833 ± 38.22 ^a	73.833 ± 4.82	108.5 ± 11.73 ^{ab}
DExAgNP	360.833 ± 61.70 ^b	63.666 ± 2.37	95.833 ± 13.64 ^{bc}

Los resultados están expresados como la media ± E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$). NEC, normoglucémicas administradas con extracto; NExAgNP, normoglucémicas administradas con la combinación extracto-AgNP; DEC, diabéticas administradas con extracto; DExAgNP, diabéticas administradas con la combinación extracto-AgNP.

6.6 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la producción de especies reactivas de oxígeno

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) fue medida en mitocondrias aisladas de cerebro en los diferentes grupos (figura 6). Los resultados mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) de la producción de ERO en el grupo diabético (1.6 veces mayor) con respecto al grupo control cuando las mitocondrias fueron incubadas previamente con glutamato y malato. Mientras que los grupos diabético administrados con el extracto y diabético administrado con la combinación extracto-AgNP mostraron ambos una disminución significativa de la producción de ERO con respecto al grupo diabético, además no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control; no se observó significancia estadística entre los grupos diabéticos administrados con los tratamientos. Por otro lado, los dos grupos normoglucémicos administrados con los tratamientos no mostraron modificación en la producción de ERO con respecto al grupo control.

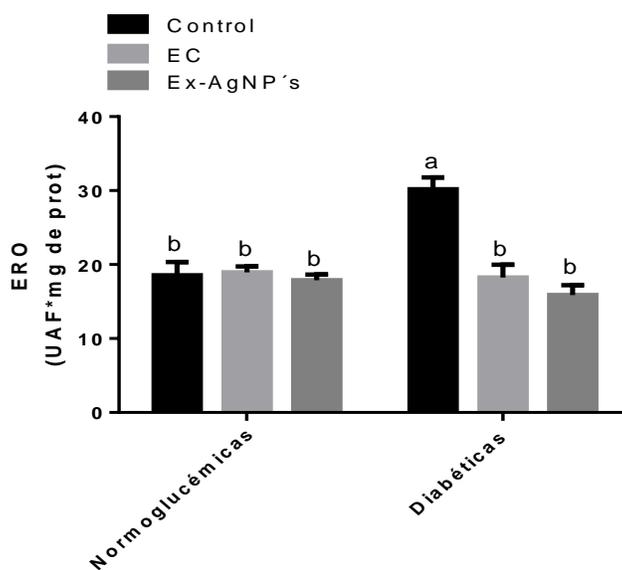


Figura 6. Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-AgNP en la producción de ERO. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$). EC, administración con el extracto; Ex-AgNP, administración con la combinación extracto-AgNP.

6.7 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas en la peroxidación de lípidos en mitocondrias.

La peroxidación de lípidos fue medida en mitocondrias aisladas de cerebro previamente lavadas (figura 7). Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) de la peroxidación de lípidos en el grupo diabético con respecto al grupo control (1.7 veces mayor). Mientras que los grupos diabéticos administrados tanto con el extracto como con la combinación extracto-AgNP mostraron una disminución significativa de la peroxidación de lípidos con respecto al grupo diabético (1.4 y 1.5 veces menor respectivamente), además no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. Por otro lado, los dos grupos normoglucémicos administrados con los tratamientos no mostraron modificación en la peroxidación de lípidos con respecto al grupo control.

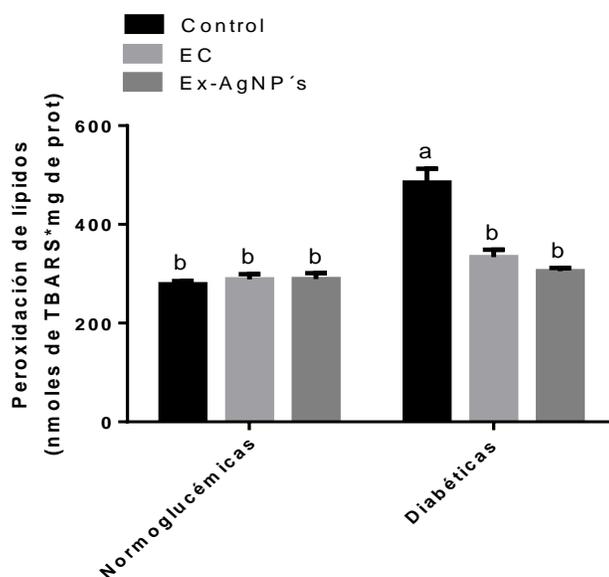


Figura 7. Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-AgNP en la peroxidación de lípidos. Los resultados están expresados como la media \pm E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$). EC, administración con el extracto; Ex-AgNP, administración con la combinación extracto-AgNP.

6.8 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la actividad de enzimas antioxidantes en cerebro.

La actividad de tres enzimas antioxidantes, la catalasa, la SODmt y la glutatión peroxidasa (GPx) fue medida en las muestras obtenidas de cerebro (figura 8A, 8B, 8C). La actividad de la catalasa medida en muestras de homogenado de tejido cerebral no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales, como se muestra en la figura 8A. Por otro lado, la actividad de la SODmt medida en mitocondrias aisladas de cerebro en el grupo diabético mostró una disminución significativa de la actividad ($p \leq 0.05$), con respecto al grupo control como se muestra en la figura 8B. Mientras que ambos grupos diabéticos administrados con los tratamientos mostraron restaurar la actividad de la SODmt, debido a que ambos grupos mostraron un incremento significativo de la actividad con respecto al grupo diabético y no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. Por otro lado, la actividad de la SODmt en los grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostró modificación de la actividad con respecto al grupo control. Mientras que la actividad de la GPx, medida en mitocondrias de cerebro mostro un comportamiento similar a la de la actividad de la SODmt, ya que se observó una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la actividad de esta enzima en el grupo diabético con respecto al grupo control, como se observa en la figura 8C, mientras que los grupos diabéticos administrados con los tratamientos mostraron restaurar la actividad de la enzima, ya que incrementaron significativamente su actividad con respecto al grupo diabético y no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. Por otro lado, la actividad de la GPx en los grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostraron modificación con respecto al grupo control.

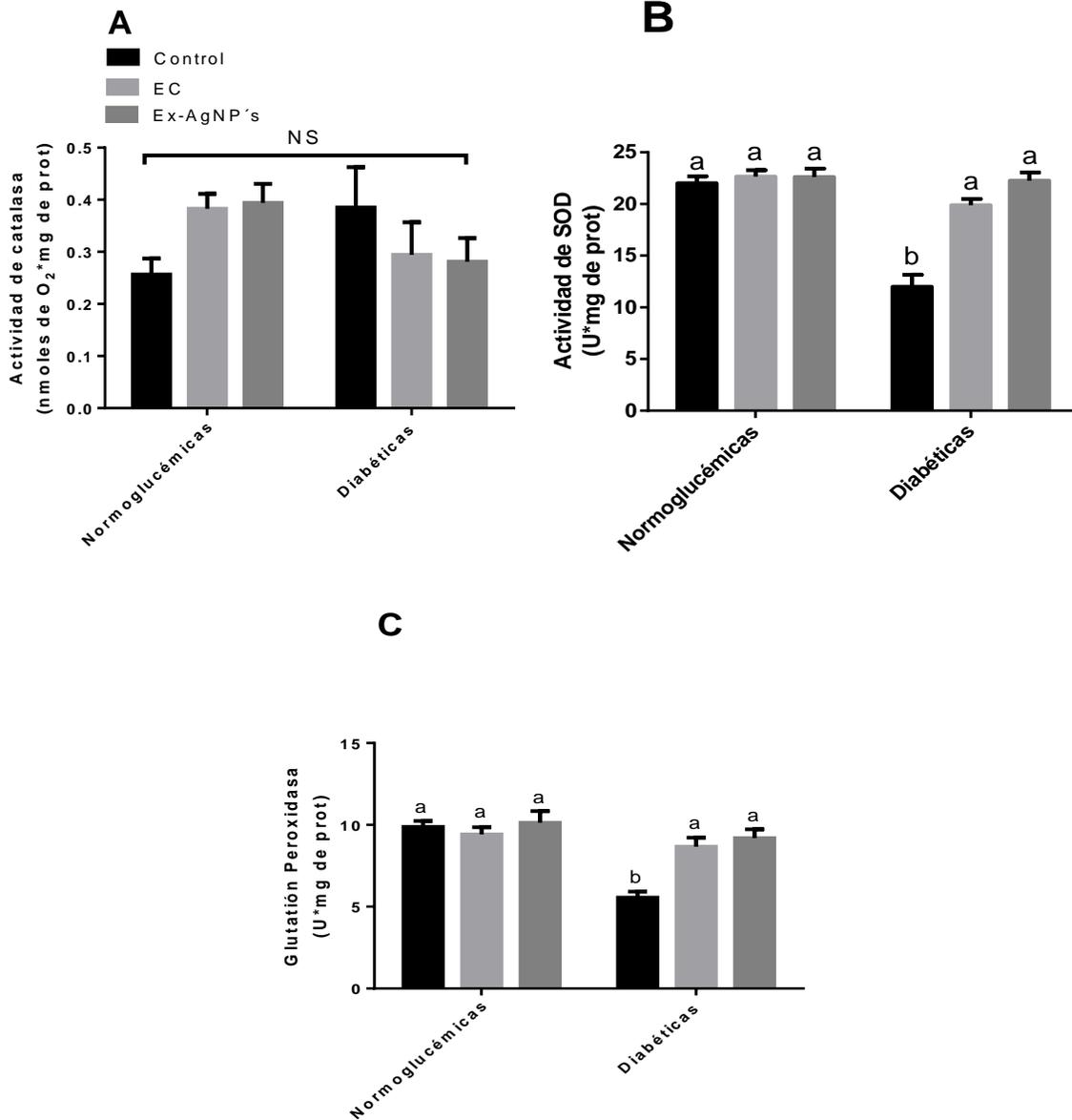


Figura 8. Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-AgNP en la actividad de enzimas antioxidantes. **(A)** Actividad de catalasa, **(B)** actividad de SODmt, **(C)** actividad de la GPx. Los resultados están expresados como la media ± E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$). EC, administración con el extracto; Ex-AgNP, administración con la combinación extracto-AgNP.

6.9 Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-nanopartículas (Ex-AgNP) en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) mitocondrial en cerebro.

Se evaluó la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE), para determinar el impacto de la diabetes, así como ambos tratamientos en la actividad de los complejos en mitocondrias aisladas de cerebro (figura 9). En la figura 9A se muestra la actividad del complejo I, en donde se encontró una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la actividad del grupo diabético con respecto al grupo control, mientras que el grupo diabético administrado con el extracto mostró un incremento en la actividad con respecto al grupo diabético, sin embargo no fue significativo con respecto al mismo grupo, no obstante tampoco mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (aunque la actividad fue ligeramente menor), mientras que el grupo diabético administrado con la combinación extracto-AgNP mostró un incremento significativo de la actividad con respecto al grupo diabético y no mostró modificación de la actividad con respecto al grupo control. Por otro lado, los dos grupos normoglucémicos administrados con ambos tratamientos no mostraron modificación en la actividad con respecto al grupo control. En la figura 9B se muestra la actividad del complejo II, en donde se encontró una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la actividad en el grupo diabético con respecto al grupo control, mientras que ambos grupos diabéticos administrados con los dos tratamientos mostraron restaurar la actividad del complejo II, debido a que ambos grupos mostraron un incremento significativo de la actividad con respecto al grupo diabético y no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. Por otro lado, ambos grupos normoglucémicos administrados con los tratamientos no mostraron modificación en la actividad del complejo II con respecto al grupo control. En la figura 9C se muestra la actividad del segmento II + III, en donde se muestra una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la actividad en el grupo diabético con respecto al grupo control, mientras que los dos grupos diabéticos administrados con los tratamientos restauraron la actividad, debido a que ambos grupos mostraron un incremento significativo de la actividad con respecto al grupo diabético y no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control, sin embargo, el grupo diabético administrado con la combinación extracto-AgNP mostró una actividad significativamente mayor con respecto al grupo diabético administrado solo con el extracto. Por otro lado, el grupo normoglucémico administrado solo con el extracto no mostró modificación de la actividad con respecto al grupo control, sin embargo, el grupo normoglucémico administrado con la combinación extracto-AgNP mostró un incremento significativo de la actividad con respecto al grupo control. En la figura 9D se muestra la actividad del complejo IV, en donde los resultados mostraron una ligera disminución de la actividad en el grupo diabético con respecto al grupo control, sin embargo, no fue significativa ($p \leq 0.05$), mientras que los dos grupos diabéticos administrados con los tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos diabético (aunque la actividad fue ligeramente mayor con respecto al grupo diabético) y control. Por otro lado, ambos grupos normoglucémicos administrados con los tratamientos no modificaron la actividad del complejo IV con respecto al grupo control.

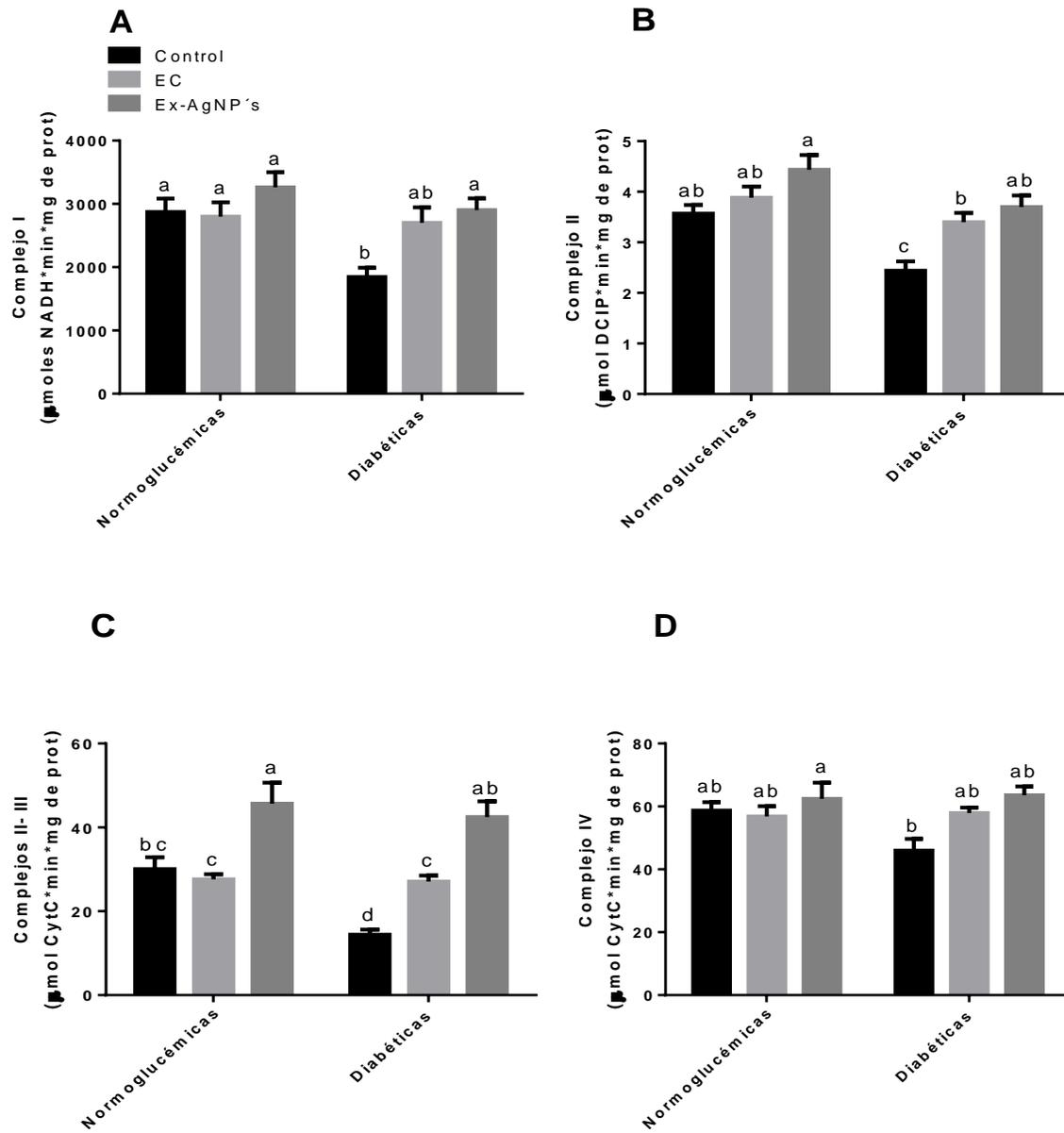


Figura 9. Efecto de la administración del extracto y la combinación extracto-AgNP en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones. (A) Actividad del complejo I, (B) actividad del complejo II, (C) actividad del segmento II + III, (D) actividad del complejo IV. Los resultados están expresados como la media ± E.E. ANOVA, Tukey, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$). EC, administración con el extracto; Ex-AgNP, administración con la combinación extracto-AgNP.

7. DISCUSIÓN

La DM es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, con una prevalencia cada vez mayor tanto en la población mundial como nacional (IDF 2019). Los tratamientos farmacológicos convencionales con el transcurso del tiempo son más costosos, y debido a esta situación en la actualidad se busca tener tratamientos alternativos, eficaces y/o a un costo menor. El consumo de extractos de plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades, entre ellas la DM, se ha realizado durante miles de años, y se han observado efectos positivos sobre los problemas de salud a tratar (Arumugam et al., 2013), sin embargo, su utilización hasta hoy en día sigue siendo empírica y se deben tener más datos sobre la toxicidad, la dosis necesaria para generar una respuesta favorable, etc. Entre las plantas reportadas que tienen propiedades antidiabéticas esta *Eryngium carlinae*, una planta endémica en México y conocida como “hierba del sapo”, de la cual ya se han reportado previamente trabajos en los que su uso como un tratamiento alternativo contra la DM es prometedor (Peña-Montes et al., 2019; Noriega-Cisneros et al., 2019; García-Cerrillo et al., 2018). Por otro lado, en años recientes se han buscado nuevas estrategias para incrementar la efectividad de los fármacos, y una de estas estrategias es el uso de nanopartículas, las cuales actúan como acarreadores de fármacos, su uso es muy prometedor ya que en reportes previos se ha demostrado que pueden descargar fármacos en sitios específicos, atravesar las barreras biológicas con mayor rapidez y así garantizar su efecto (Zhang et al., 2020; Mulvihill et al., 2020). Una técnica de síntesis de nanopartículas es la técnica de síntesis verde, en la cual se combina la utilización de un extracto vegetal para sintetizar las nanopartículas, y posteriormente los compuestos del extracto quedan adheridos a la superficie de la nanopartícula, y en reportes previos se ha mostrado que este tipo de síntesis ha tenido efectos positivos y prometedores para poder utilizarse como un tratamiento antidiabético (Shah et al., 2015; Silva et al., 2019). Así, se plantea la hipótesis de que las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del extracto acuoso de *E. carlinae* incrementan los efectos hipoglucémicos y antioxidantes en un modelo de diabetes experimental.

La técnica de síntesis verde de nanopartículas consiste en la reducción de iones metálicos mono o divalentes mediante los compuestos bioactivos presentes en los extractos vegetales, como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, polifenoles, terpenoides, etc. En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata, a partir del extracto acuoso de las partes aéreas de *E. carlinae* y una solución acuosa de AgNO_3 . En este trabajo se lograron sintetizar nanopartículas de plata con las condiciones de reacción que se utilizaron, al realizar la reacción de síntesis verde se pudo observar un cambio de coloración a un color marrón-rojizo, con lo que se sugirió inicialmente la síntesis de AgNP, ya que este cambio de coloración es característico de la reducción de iones plata, y la posterior formación de nanopartículas (figura 2A). Para confirmar la síntesis de AgNP se obtuvo el espectro de absorbancia UV-Vis (figura 2B), en donde se compararon tanto el espectro del extracto, como el de las AgNP, y se observó en el espectro de las AgNP un pico a 445 nm, que se encuentra dentro del rango característico de la excitación del plasmón superficial (EPS) de las AgNP, el fenómeno de EPS en las nanopartículas es debido a la oscilación colectiva de los electrones de conducción presentes en la superficie de la nanopartícula, cuando estos son excitados por una luz de una

longitud de onda específica (Sharma et al., 2020). Y cuando el espectro de las AgNP se comparó con el del extracto, este último no observó el pico a 445 nm, por lo que con esto se confirmó la síntesis de nanopartículas mediante la síntesis verde. Para comprobar la formación de las AgNP, posteriormente, se realizó un mapeo químico con microscopia electrónica de barrido (figura 3), con este resultado se pudo observar que las nanopartículas sintetizadas están formadas por Ag elemental, también se observó su tamaño, el cual se encuentra entre los 10 a 20 nm aproximadamente, y se observaron estructuras monodispersas, es decir que todas las estructuras son similares en tamaño.

La evaluación fitoquímica del extracto acuoso de las partes aéreas de *E. carlinae* mostró a los flavonoides como los compuestos que se encuentran presentes con mayor abundancia en el extracto (Tabla 4), y además también mostró presencia de terpenos y compuestos fenólicos, previamente se han realizado evaluaciones fitoquímicas más precisas de diferentes extractos de *E. carlinae*, en donde se han identificado diferentes compuestos, en especial, terpenos, sesquiterpenos (Peña-Montes et al., 2019; Noriega-Cisneros et al., 2019), ácidos fenólicos, flavonoides y saponinas (Pérez-Ramírez et al., 2016). Se midió la capacidad antioxidante *in vitro* tanto del extracto como de la combinación Ex-AgNP para evaluar las propiedades antioxidantes antes de la administración a nuestro modelo biológico, se observó que tanto en la prueba de actividad anti-DPPH, como la prueba de capacidad antioxidante total; en estos ensayos se observó que la actividad antioxidante es dependiente a la concentración, es decir a mayor concentración del extracto y la combinación, mayor actividad antioxidante. Previamente se han reportado trabajos con diferentes extractos de *E. carlinae* en donde ha presentado actividad antioxidante *in vitro* (Peña- Montes et al., 2019; García-Cerrillo et al., 2018).

En este trabajo se reporta un incremento significativo de los niveles de glucosa en el grupo diabético, 6.5 veces mayor con respecto al grupo control (figura 5A) esto como resultado de la administración con STZ, la cual es un agente altamente citotóxico y selectivo hacia las células β pancreáticas, que en altas dosis puede causar una necrosis total de las células β dentro de las posteriores 48 h a la administración (Furman 2015). Sin embargo, se observó una disminución significativa de los niveles de glucosa en el grupo diabético administrado con la combinación extracto-AgNP (fig. 5A y tabla 5). En contraste, el grupo diabético administrado solo con el extracto mostro una ligera disminución en los niveles de glucosa, sin embargo, no fue significativo con respecto al grupo diabético, por lo que el efecto antidiabético se puede atribuir directamente a las AgNP; previamente, se ha reportado que las AgNP incrementan significativamente los niveles de insulina sérica en ratas diabéticas (Alkaladi et al., 2014; Hussein et al., 2018; Shanker et al., 2017). Además, en estudios previos las AgNP han mostrado inhibir las α -glucosidasas y las α -amilasas intestinales (Balan et al., 2016; Johnson et al., 2017; Prabhu et al., 2017). Estas enzimas digestivas de carbohidratos, que son responsables de degradar los oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos adecuados para la absorción (Sales et al., 2012). La inhibición de estas dos enzimas es especialmente útil para el tratamiento de la diabetes, porque retrasa la absorción y la liberación de la glucosa a la sangre (Podsędek et al., 2014); por lo que, la disminución de los niveles de glucosa observados en el grupo diabético administrado con la combinación podría

estar relacionado con estos dos mecanismos. Por otro lado, se observó una disminución significativa del peso corporal durante el tratamiento en el grupo diabético con respecto al grupo control (figura 5B), mientras que ambos grupos diabéticos administrados con los tratamientos también mostraron una disminución significativa del peso corporal, y ambos no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo diabético.

La diabetes es un desorden que presenta hiperglucemia crónica debido a la deficiencia de la acción de la insulina, pero los lípidos séricos también son fuertemente afectados por la insulina (Hirano, 2018). La dislipidemia se observa comúnmente en la población diabética independientemente sea tipo 1 o tipo 2 (Reaven y Greenfield, 1981; Taskinen 2003). La hipercolesterolemia severa no es frecuentemente observada en la población diabética, más bien la hipertrigliceridemia y el c-HDL bajo son más comunes (Hirano, 2018). Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de triglicéridos en el grupo diabético con respecto al grupo control (tabla 5), este incremento puede estar relacionado a la incapacidad de utilizar carbohidratos en tejidos insulino dependientes, lo que causa un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo, y un incremento subsecuente de triglicéridos en la circulación sanguínea (Noriega-Cisneros et al., 2019). Mientras que el grupo diabético administrado únicamente con el extracto mostró una ligera disminución, sin embargo no fue significativa con respecto al grupo diabético, por otro lado, el grupo diabético administrado con la combinación extracto-AgNP mostró una disminución significativa con respecto al grupo diabético, por lo que la actividad hipoglucémica podría estar relacionada con las AgNP y con los componentes del extracto, ya que entre ambos grupos diabéticos administrados no se observaron diferencias significativas, y previamente se ha reportado que los flavonoides presentan efectos hipolipidémicos (Yin et al., 2018; Eid y Haddad, 2017; Jung et al., 2004; Valsecchi et al., 2011; Nizamutdinova et al., 2009), el mecanismo principal es por inhibición de la lipólisis.

La hiperglucemia crónica provoca un incremento en el ingreso de glucosa al cerebro, debido a que es un órgano insulino independiente, y esta sobrecarga se encuentra íntimamente relacionada con un incremento en la producción de ERO por activación de diferentes vías como la de polioles, hexosamina, PKC y la vía mitocondrial, la cual es la principal productora de ERO (Muriach et al., 2014; Nagalski et al., 2016; Peña-Montes et al., 2019; Raza et al., 2015). En este trabajo se observó un incremento significativo en la producción de ERO en mitocondrias cerebrales del grupo diabético (figura 6), cuando estas fueron energizadas con glutamato y malato, por otro lado, los grupos diabéticos administrados tanto con el extracto como con la combinación extracto-AgNP disminuyeron significativamente la producción de ERO. La disminución en la producción de ERO en los grupos diabéticos administrados con los tratamientos estuvo relacionada con la disminución observada en la peroxidación de lípidos en mitocondrias aisladas de cerebro en estos mismos grupos (figura 7), mientras que el grupo diabético mostró un incremento significativo de la peroxidación de lípidos. Ambos resultados indican un desbalance entre la producción de ERO y la actividad de los sistemas antioxidantes. Además, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos tanto en la producción de ERO y la peroxidación de lípidos, por lo que estos efectos se pueden atribuir directamente a los compuestos del extracto

acuoso de *E. carlinae*, ya que previamente se ha reportado que diferentes extractos de *E. carlinae* mostraron disminuir tanto la producción de ERO como la peroxidación de lípidos (Peña-Montes et al., 2019; García-Cerrillo et al., 2019), y se han reportado las vías por las que los metabolitos secundarios pueden ejercer su efecto antioxidante, neutralizando directamente ERO (Teixeira 2018), disminuyendo la formación de radicales hidroxilo dependientes de metales (Cu^+ y Fe^{2+}) a través de la reacción de Fenton, principalmente a través de un mecanismo de quelación (Teixeira et al., 2018), incrementando la actividad de enzimas antioxidantes (Kosuru et al., 2017) o modulando ciertas vías de señalización relacionadas con la actividad de los sistemas antioxidantes como la vía de Nrf2 o AMPK/SIRT/PGC1- α , que es la vía maestra para la regulación de la homeostasis metabólica, energética y la biogénesis mitocondrial (Hardie 2007; Hardie 2008; Greco et al., 2011), y en particular, los flavonoides han mostrado regular la actividad de Nrf2, la proteína maestra de la regulación de los genes antioxidantes (Mansuri et al., 2014; Li et al., 2018; Zhou et al., 2019; Khan et al., 2020).

Posteriormente, se midió la actividad de tres enzimas antioxidantes, la SODmt, que dismuta el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en H_2O_2 , la GPx, que degrada el H_2O_2 en H_2O , con la oxidación de una molécula de NADPH, y la catalasa que degrada el H_2O_2 en agua y oxígeno en el citosol celular. En este trabajo no se observaron diferencias significativas en la actividad de la catalasa entre ninguno de los grupos (figura 8a). Estos resultados fueron similares a los reportados previamente en el mismo tejido y con el mismo modelo de inducción (Peña-Montes et al., 2019); sin embargo, previamente se ha reportado una disminución de la actividad de la catalasa en diferentes regiones cerebrales (Raza et al., 2015; Huerta-Cervantes et al., 2020; Hemmati et al., 2018). Este contraste entre los resultados obtenidos en este trabajo y otros trabajos anteriormente reportados podría deberse al tiempo en el que consistió el experimento, o el modelo de diabetes experimental que se utilizó. Por otro lado, los resultados obtenidos de la actividad de la SODmt (figura 8B) y la GPx (figura 8C) mostraron una disminución significativa de la actividad en el grupo diabético con respecto al grupo control, se ha reportado que la disminución en la actividad tanto de la SODmt como de la GPx puede deberse a modificaciones postraduccionales en la estructura de estas enzimas, debidas al incremento de la producción de ERO y ERN en la diabetes (Sharma et al., 2015 Oboh et al., 2018); en específico por la reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el NO que producen ONOO, y se ha reportado previamente que este radical reacciona con residuos de Tyr, en específico de la Tyr34 del sitio activo de la SODmt (Kitada et al., 2020; Yamakura y Kawasaki, 2010); también se ha reportado que la alteración de las vías de señalización de AMPK/SIRT/PGC-1 α y Nrf2 inducen una disminución en la expresión de la SODmt y la GPx (Chowdhury et al., 2018; St. Pierre et al., 2006). Por otro lado, los grupos diabéticos administrados tanto con el extracto como con la combinación extracto-AgNP restauraron la actividad tanto de la SODmt como de la GPx (figura 8B y 8C), y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, por lo que este incremento se atribuye directamente a los metabolitos secundarios presentes en el extracto de *E. carlinae*, ya que se ha reportado previamente que, en particular, los flavonoides han mostrado modular los niveles de antioxidantes celulares y enzimas antioxidantes, entre ellas la SODmt y la GPx (Sandoval-Acuña et al., 2014; Heim et al., 2002). También los flavonoides y otros metabolitos secundarios regulan vías de

señalización relacionadas a la actividad de los sistemas antioxidantes o pueden actuar directamente neutralizando ERO o inhibiendo su formación.

Finalmente, se midió la actividad de los complejos de la CTE, los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de la actividad en los complejos I (figura 9A), II (figura 9B) y el segmento II + III (figura 9C), así como una ligera disminución en la actividad del complejo IV (figura 9D) en el grupo diabético, con respecto al grupo control. Previamente, se ha reportado una disminución en la actividad de los complejos de la CTE en diferentes regiones cerebrales. Anteriormente, se ha reportado una disminución en la expresión de algunos componentes de los complejos de la CTE, como NDUFB8, que es una proteína accesoria del complejo I; así mismo se ha observado una disminución de la expresión de SDHB, la cual es una subunidad del complejo II. SDHB es muy importante en la actividad del complejo II, ya que contiene tres centros Fe-S que se encargan de transportar los electrones desde el FADH₂ hasta la ubiquinona, y una disminución en su expresión representaría una deficiencia en la transferencia de electrones, y resulta en una mayor producción de ERO (Chowdhury et al., 2018). También, se ha relacionado que el incremento en el consumo de oxígeno en las mitocondrias durante la diabetes incrementa la producción de ERO, y esto provoca la disfunción de los complejos de la CTE, lo cual implica, una mayor producción de ERO debida a la fuga de electrones (Raza et al., 2015; Muller et al., 2004; Hoffman y Brookes, 2009). Esto puede ser resultado del incremento de los sustratos de la CTE durante la diabetes, que se ha asociado con un mayor transporte de electrones, y este incremento da lugar a una mayor fuga de electrones (Sivitz y Yorek, 2010), especialmente a nivel de los complejos I y III (Sivitz y Yorek, 2010; Raha y Robinson, 2000; Han y Cárdenas, 2001; St. Pierre et al., 2002), ya que ante un flujo elevado de electrones, se ha observado un incremento en la vida media del FMNH₂ en el complejo I (Sazanov 2007) y de la semiquinona producida durante el ciclo Q en el complejo III (Skulachev 1998). Este incremento en la vida media de estas dos especies induce una fuga de electrones de la CTE, y posteriormente, una mayor producción de ERO (Sivitz y Yorek, 2010). Estas observaciones se encuentran relacionadas con la actividad del complejo III durante condiciones de hiperglucemia, ya que se ha reportado que las modificaciones postraduccionales en este complejo y la disfunción en su actividad se encuentran relacionadas con una mayor producción de ERO (Ortíz-Ávila et al., 2013; Chowdhury et al., 2018). Estas observaciones concuerdan con los datos obtenidos en este trabajo, ya que la disfunción que se observó en la actividad de la CTE (figura 9), está relacionada con la mayor producción de ERO (figura 6), y con un incremento en el daño oxidativo, medido como peroxidación de lípidos en mitocondrias (figura 7). Mientras que en los grupos diabéticos administrados con los tratamientos mostraron una restauración de la actividad tanto del complejo I, II y del segmento II + III, en donde no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, por lo que la restauración de la actividad de los complejos se atribuye a los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de *E. carlinae*. Previamente, se ha reportado que los flavonoides, en particular la quercetina, pueden actuar neutralizando directamente la formación de O₂^{•-} a nivel del complejo III de la CTE (Dudylyna et al., 2019), lo cual concuerda con las observaciones vistas en nuestro trabajo, en la disminución de la producción de ERO y la peroxidación de lípidos en mitocondrias en los dos grupos diabéticos

tratados, además, podrían actuar activando vías de señalización relacionadas con la regulación del metabolismo mitocondrial, como la vía de AMPK/SIRT/PGC1 α , la cual está involucrada en la biogénesis mitocondrial y la expresión de genes relacionados con el metabolismo (Hardie 2008; Greco et al., 2011), lo cual podría explicar la restauración de la actividad de los complejos de la CTE en los grupos con tratamiento comparados con el grupo diabético.

El mecanismo de acción por el cual el tratamiento tanto con el extracto como con la combinación extracto-AgNP mostró disminuir el daño oxidativo en el cerebro de ratas diabéticas es por neutralización directa de las ERO, la disminución en la producción de ERO en mitocondrias de cerebro estuvo relacionada con la disminución de la peroxidación de lípidos, lo cual se debe a la neutralización de ERO y además se ha reportado que los flavonoides y otros metabolitos secundarios pueden inhibir la formación de radical OH \cdot dependiente de metales por un mecanismo de quelación (Teixeira et al., 2018), esta disminución de la producción de ERO en estos dos grupos está relacionada con la restauración de la actividad tanto de la SODmt, la GPx y los complejos de la CTE, ya que previamente se ha reportado una disminución de su actividad debido a modificaciones postraduccionales por el incremento en la producción de ERO. Por otro lado, también se ha reportado que los flavonoides y otras clases de metabolitos secundarios activan vías de señalización como la de Nrf2 que se encuentra relacionada con la actividad de los sistemas antioxidantes o la vía de PGC1 α que está relacionada con la biogénesis, la respiración y el metabolismo oxidativo mitocondrial (Mansuri et al., 2014; Li et al., 2018; Chowdhury et al., 2018). Además el tratamiento con la combinación extracto-AgNP disminuyó los niveles de glucosa en sangre, previamente se ha reportado que las AgNP incrementan los niveles de insulina en sangre (Alkaladi et al., 2014; Hussein et al., 2018; Shanker et al., 2017), lo cual estaría relacionado con la disminución de los niveles de glucosa, que se observó en el grupo diabético administrado con este tratamiento, además este resultado correlaciona con la disminución de los niveles de triglicéridos, que está relacionado a una mayor utilización de carbohidratos por tejidos insulino dependientes, lo que inhibe la lipólisis del tejido adiposo y por lo tanto una menor concentración de triglicéridos en sangre (Yin et al., 2018; Eid y Haddad, 2017; Jung et al., 2004).

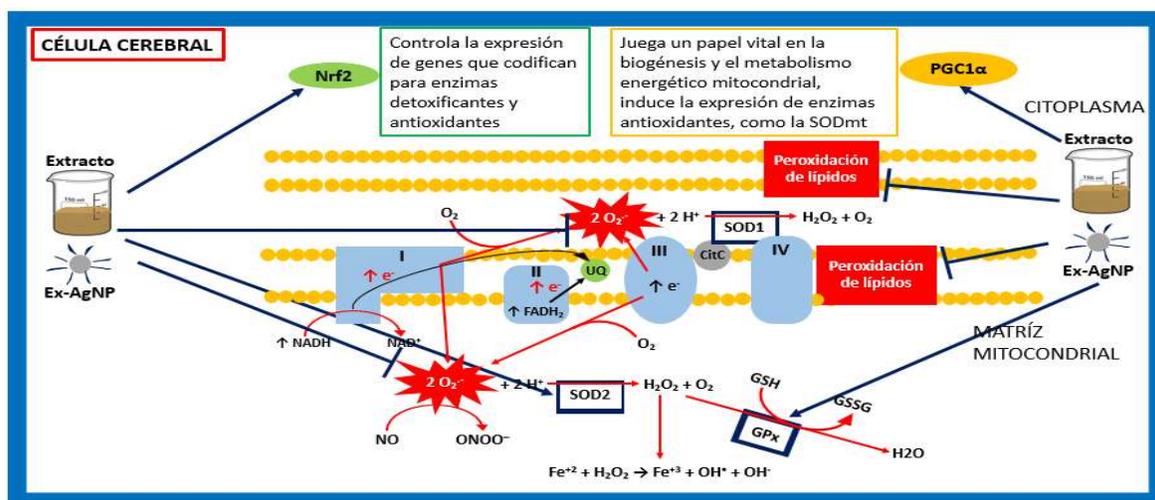


Figura 10. Mecanismo de acción propuesto del extracto y la combinación extracto-AgNP.

8. CONCLUSIONES

Se obtuvo que los flavonoides son los metabolitos secundarios más abundantes presentes en el extracto acuoso de *Eryngium carlinae*, debido a la naturaleza polar del extracto.

El extracto acuoso de *Eryngium carlinae* presenta los compuestos adecuados para realizar la reacción de síntesis verde de nanopartículas con un tamaño de 10-30 nm.

La diabetes experimental incrementa la producción de ERO, conduciendo a un desbalance redox, daño oxidativo en las mitocondrias y disfunción de la CTE.

La administración tanto del extracto, como con la combinación de extracto-AgNP previene los daños oxidantes y la disfunción de la CTE en el cerebro de ratas diabéticas.

9. PERSPECTIVAS

- Obtener tres diferentes extractos de *Eryngium carlinae* (acuoso, metanólico, acetato de etilo) para la síntesis de nanopartículas de plata, y medir su actividad antioxidante *in vitro*.
- Estudiar la actividad antidiabética, antioxidante y sobre la función mitocondrial cerebral del o los extractos con mayor actividad antioxidante *in vitro* y/o con mayor obtención de nanopartículas de plata, y administrarlos en un modelo de ratas con diabetes.
- Evaluar parámetros de daño hepático y renal tras la administración con los tratamientos.
- Medir la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como los parámetros de daño oxidativo y nitrosativo.
- Medir los niveles de GSH, así como, de la actividad de la glutatión reductasa y glutatión peroxidasa
- Medir la actividad y los niveles de expresión de la SOD1 y SOD2.

- Medir la actividad y los niveles de expresión de los complejos de la cadena transportadora de electrones.
- Medir los niveles de expresión de los marcadores de inflamación en suero y en el cerebro.
- Medir los niveles de expresión de las proteínas Nrf2, PGC1 α y SIRT3 en el cerebro, y estudiar su relación con la funcionalidad mitocondrial en un modelo de diabetes.

10. REFERENCIAS

Abbott, N.J.; Patabendige, A.K.; Dolman, E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease* 2010, 37, 13-25.

Afifi, M.; Abdelazim, A.M. Ameliorative effect of zinc oxide and silver nanoparticles on antioxidant system in the brain of diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015, 5(10), 874–877.

Ai, J.; Biazar, E.; Jafarpour, M.; Montazeri, M.; Majdi, A.; Aminifard, S.; Zafari, M.; Akbari, H.R.; Rad, H.G. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int. J. Nanomed.* 2011, 6, 1117–1127.

Akerboom, T. P. M.; Sies, H. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology* 1981, 77, 373–382.

Akhtar, M.S.; Panwar, J.; Yun, Y.S. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2013, 1, 591–602.

Al-Ishaq, R.K.; Abotaleb, M.; Kubatka, P.; Kajo, K.; Büsselberg, D. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules* 2019, 9, 430.

Alkaladi, A.; Abdelazim, A.M.; Afifi, M. Antidiabetic Activity of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 2015-2023.

Aniszewski, T. Alkaloids-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. 2007. Elsevier.

Aromal, S.A.; Philip, D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size dependent catalytic activity. *Spectrochim. Acta A* 2012, 97, 1–5.

Arumugam, G.; Manjula, P.; Paari, N. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease* 2013, 196-200.

Ayoub, N.; Al-Azizi, M.; Konig, W.; Kubeczka, K.H. Essential oils and a novel polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michx. (Apiaceae). *Recent Prog. Med. Plants* 2006, 11, 237-245.

Ayoub, N.A.; Kubeczka, K.H.; Nawwar, M.A.M. An unique n-propyl sesquiterpene from *Eryngium creticum* L. (Apiaceae). *Pharmazie*, 2003, 58 (9), 674-676.

Balamurugan, R.; Ignacimuthu, S. Antidiabetic and hypolipidemic effect of methanol extract of *Lippia nodiflora* L. in STZ induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2011, 1, S30-36.

Balan, K.; Qing, W.; Wang, Y.; Liu, X.; Palvannan, T.; Wang, Y.; Maa, F.; Zhang, Y. Antidiabetic activity of silver nanoparticles from green synthesis using *Lonicera japonica* leaf extract. *RSC Adv.*, 2016, 6, 40162.

Barham, D.; Trinder, P. "An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system," *The Analyst* 1972, 97(1151), 142–145.

Battaglia, M. Experiments by nature: lessons on type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2014, 83, 1-9.

Bierhaus, A.; Humpert, P.M.; Morcos, M. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 2005, 83, 876–886.

Bierhaus, A.; Nawroth, P.P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 2009, 52, 2251–2263.

Bierhaus, A.; Schiekofer, S.; Schwaninger, M. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 2001, 50, 2792–2808.

Birben, B.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* 2012.

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199.

Bondy, C.A., Lee, W.H., Zhou, J. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci* 1992, 3(4), 305-314.

Brown, A.M., Sickmann, H.M., Fosgerau, K., Lund, T.M., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., Ransom, B.R. Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during a glycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J Neurosci Res* 2005, 79(1-2), 74-80.

Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1978, 52, 302–310.

Bunaciu, D.; Fleschin; y Aboul-Enein. Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2015, 46(5), 389–399.

Castro, L.; Blazquez, M.L.; Munoz, J.A.; Gonzalez, F.; Garcia-Balboa, C.; Ballester, A. Biosynthesis of gold nanowires using sugar beet pulp. *Process Biochem.* 2011, 46, 1076–1082.

Castro-Torres, I.G.; De la O-Arciniega, M.; Naranjo-Rodríguez, E.B.; Castro-Torres, V.A.; Domínguez-Ortíz, M.A.; Martínez-Vázquez, M. The Hypocholesterolemic Effects of *Eryngium carlinae* F. Delarochae Are Mediated by the Involvement of the Intestinal Transporters ABCG5 and ABCG8. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017.

Cetto, A.A.; Wiedenfeld, H. Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. *J Ethnopharmacol* 2011, 133, 940-943.

Chanwitheesuk, A.; Teerawutgulrag, A.; Rakariyatham, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem.* 2005, 92 (3), 491-497.

Chawla, R. Complicaciones de la diabetes. 2013. Editorial Jhartze publishing Ciencias Médicas.

Chen, X.; Jin, J.; Tang, J.; Wang, Z.; Wanga, J.; Jin, L. Extraction, purification, characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the root of *Ophiopogon japonicas*. *Carbohydrate Polymers* 2011, 83, 749-754.

Chial, H.; Craig, J. mtDNA and Mitochondrial Diseases. *Nature Education* 2008, 1 (1):217.

Chung, S.S.M.; Ho, E.C.M.; Lam, K.S.L.; Chung, S.K. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes Induced Oxidative Stress. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14, S233–S236.

Cobley, J.N.; Fiorello, M.L.; Bailey, D.M. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology* 2018, 15, 490–503.

Cole, T.G.; Klotzsch, S.G.; McNamara, J. “Measurement of triglyceride concentration,” in *Handbook of Lipoprotein Testing*, N. Rifai, G. R. Warnick, and M. H. Dominiczak, Eds. 1997, 115–126.

CONABIO. Catálogo taxonómico de especies de México 2009. CONABIO, México.

Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007, 66,447–453.

Cortés-Rojo, C.; Calderón-Cortés, E.; Clemente-Guerrero, M.; Estrada-Villagómez, M.; Manzo-Avalos, S.; Mejía-Zepeda, R.; Boldogh, I.; Saavedra-Molina, A. Elucidation of the

effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J Bioenerg Biomembr* 2009, 41, 15–28.

Coughlan, M.T.; Thorburn, D.R.; Penfold, S.A. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20, 742–752.

Dai, J.; Mumper, R.J. “Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties.” *Molecules* 2010, 15(10), 7313-7352.

Dai, Z.; Yao, Q.; Zhu, L. MMP2-sensitive PEG–lipid copolymers: a new type of tumor-targeted P-glycoprotein inhibitor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 12661–12673.

Daisy, P.; Saipriya, K. Biochemical analysis of *Cassia fistula* aqueous extract and phytochemically synthesized gold nanoparticles as hypoglycemic treatment for diabetes mellitus. *Int J Nanomed.* 2012, 7, 1189–1202.

Dall'Acqua, S.; Cervellati, R.; Loi, M.C.; Innocenti, G. Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chem.* 2007, 106 (2), 745-749.

Date, A.A.; Hanes, J.; Ensign, L.M. Nanoparticles for oral delivery: design, evaluation and state-of-the-art. *J. Control. Release* 2016, 240, 504–526.

Deeg, R.; Ziegenhorn, J. “Kinetic enzymic method for automated determination of total cholesterol in serum,” *Clin Chem.* 1983, 29(10), 1798–1802.

DiMeglio, L.; Evans-Molina, C.; Oram, R. Type 1 diabetes. *Lancet* 2018, 391, 2449–2462.

Drake, D.; Lam, J. Seseli acetylene from *Eryngium bourgatti*. *Phytochemistry* 1972, 11 (8), 2651-2652.

Du, Y.; Miller, C.M.; Kern, T.S. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med* 2003, 35, 1491–1499.

Dudykina, A.; Ivanova, M.; Shumaev, K.; Ruuge, E. Superoxide formation in cardiac mitochondria and effect of phenolic antioxidants. *Cell Biochem. Biophys.* 2019, 77, 99-107.

Dwivedi, A.D.; Gopal, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids Surf. A* 2010, 369, 27–33.

Ealias, A.M. y Saravanakumar M.P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 2017, 263.

Ebrahimzadeh, M.; Nabavi, S. M.; Nabavi, S.F.; Eslami, S.; Bekhradnia, A.R. Mineral elements and antioxidant activity of three locally edible and medicinal plants in Iran. *Asian J. Chem.* 2010, 22 (8), 6257-6266.

Eid, H.M.; Haddad, P.S. The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Curr. Med. Chem.* 2017, 24, 355–364.

Elberry, A.A.; Harraz, F.M.; Ghareib, S.A.; Gabr, S.A.; Nagy, A.A.; Sattar, E.A. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes Mellitus* 2011, 3, 37-44.

Eliza, J.; Diasy, P.; Ignacimuthu, S.; Duraipandiyam, V. Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen. Sm. in STZ-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2009, 182, 67-72.

Eynard, A.R.; Valentich, M.A, Robasio, R.A. Histología y Embriología del ser humano Bases celulares y moleculares. 2008. Editorial Médica Panamericana.

Feldman, E.; Callaghan, B.; Pop-Busui, R.; Zochodne, D.; Wright, D.; Bennett, D.; Bril, V.; Russell, J.; Viswanathan, V. Diabetic neuropathy. *Nature Reviews* 2019, 5:41.

Feshani, A.M.; Kouhsari, S.M.; Mohammadi, S. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: Molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxandiabetic Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2011, 133, 67-74.

Furman, B.L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2015, 5.47.1-5.47.20.

Gahl, W. Mitochondria. National Human Genome Research Institute 2017.

Galicía-García, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Siddiqi, H.; Uribe, K.; Ostolaza, H.; Martín, C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6275.

Gandhi, G.R.; Ignacimuthu, S.; Paulraj, M.G.; Sasikumar, P. Antihyperglycemic activity and antidiabetic effect of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. fruit in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2011, 670, 623-631.

García-Berumen, C.I.; Ortiz-Avila, O.; Vargas-Vargas, M.A.; del Rosario-Tamayo, B.A.; Guajardo-López, C.; Saavedra-Molina, A.; Rodríguez-Orozco, A.R.; Cortés-Rojo, C. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. *Lipids in Health and Disease* 2019, 18, 78.

García-Cerrillo, D.; Noriega-Cisneros, R.; Peña-Montes, D.; Huerta-Cervantes, M.; Ríos-Silva, M.; Salgado-Garciglia, R.; Montoya-Pérez, R.; Saavedra-Molina, A. Antioxidant Effects of *Eryngium carlinae* in Diabetic Rats. *Asian Journal of Applied Sciences* 2018, 06.

García, M.D.; Sáenz, M.T.; Gómez, M.A.; Fernández, M.A. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Pytother. Res.* 1999, 13 (1), 78-80.

Georgea, C.; Lochnera, A.; Huisamen, B. The efficacy of *Prosopis glandulosa* as antidiabetic treatment in rat models of diabetes and insulin resistance. *J Ethnopharmacol.* 2011, 137, 298-304.

Ghoul, J.E.; Boughanmi, N.G.; Attia, M.B. Biochemical study on the protective effect of ethanolic extract of *Zygophyllum album* on streptozotocin induced oxidative stress and toxicity in mice. *Biomed Preventive Nutr* 2011, 1(2), 79-83.

Greco, S.J.; Hamzelou, A.; Johnston, J.M.; Smith, M.A.; Ashford, J.W.; Tezapsidis, N. Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and beta-amyloid in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 414, 170-174.

Gupta, S.; Sharma, S.B.; Singh, U.R.; Bansal, S.K. Salutary effect of *Cassia auriculata* L. leaves on hyperglycemia-induced atherosclerotic environment in streptozotocin rats. *Cardiovasc Toxicol* 2011, 11, 308-315.

Hallberg E.M.; Shu Y.; Hallberg, R.L. *Mol Cell Biol* 1993, 13, 3050–3057.

Hardie, D.G. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)* 2008, 32 Suppl 4, S7-12.

Hardie, D.G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8, 774-785.

Harlev, A y Wiznitzer, A. New Insights on Glucose Pathophysiology in Gestational Diabetes and Insulin Resistance. *Curr Diab Rep* 2010, 10, 242-247.

Harris, J.J., Jolivet, R., Attwell, D. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 2012, 75(5), 762-777.

Hedayathullah, H.B.; Vinayagam, K.S.; Palanivelu, S.; Panchanatham, S. Anti-diabetic effect of *Semecarpus anacardium* Linn nut milk extract in a high fat diet STZ induced type 2 diabetic rat model. *Comp Clin Pathol* 2012, 21(6), 1395-1400.

Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr Biochem.* 2002, 13, 572–584.

Hemmati, A.A.; Alboghobeish, S.; Ahangarpour, A. Effects of cinnamic acid on memory deficits and brain oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2018, 22(3).

Hines, T. Anatomy of the Brain. CMI 2018, Mayfield Clinic, Cincinnati, Ohio.

Hirano, T. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2018, 25(9), 771-782.

Hoffman, D.L.; Brookes, P.S. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *J Biol Chem* 2009, 284, 16236-16245.

Horal, M.; Zhang, Z.; Stanton, R.; Virkamäki, Loeken, M.R. Activation of the Hexosamine Pathway Causes Oxidative Stress and Abnormal Embryo Gene Expression: Involvement in Diabetic Teratogenesis. *Birth Defects Research (Part A)* 2004, 70, 519–527.

Hou, S.Z.; Chen, S.X.; Huang, S.; Jiang, D.X.; Zhou, C.J.; Chen, C.Q. The hypoglycemic activity of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves in the experimental hyperglycemic rats. *J Ethnopharmacol.* 2011, 138, 142- 149.

Huang, C.S.; Yin, M.C.; Chiu, L.C. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Psidium guajava* fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2011, 41, 2189-2195.

Huerta-Cervantes, M.; Peña-Montes, D.J.; Montoya-Pérez, R.; Trujillo, X.; Huerta, M.; López-Vázquez, M.A.; Olvera-Cortés, M.E.; Saavedra-Molina, A. Gestational Diabetes Triggers Oxidative Stress in Hippocampus and Cerebral Cortex and Cognitive Behavior Modifications in Rat Offspring: Age- and Sex-Dependent Effects. *Nutrients* 2020, 12, 376.

Hulbert, A.J.; Pamplona, R.; Buffenstein, R.; Buttemer, W.A. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev* 2007, 87, 1175–1213.

Hussein, J.; El Naggar, M.E.; Latif, Y.A.; Medhat, D.; El Bana, M.; Refaat, E.; Morsy, S. Solvent-free and one pot synthesis of silver and zinc nanoparticles: Activity toward cell membrane component and insulin signaling pathway in experimental diabetes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2018, 170, 76-84.

Huyut, Z; Beydemir, S; Gülçin, I. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int.* 2017.

Ibeh, B.O.; Ezeaja, M.I. Preliminary study of antidiabetic activity of the methanolic leaf extract of *Axonopus compressus* (P.Beauv) in alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2011, 138, 713-716.

Inoguchi, T.; Battan, R.; Handler, E. Preferential elevation of protein kinase C isoform {beta}II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycaemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89, 11059–11063.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Ninth edition 2019.

Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 2011, 13, 2638–2650.

Islam, M.T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2016, 39, 73-82.

Jaghabir, M. Hypoglycemic effects of *Eryngium creticum*. *Arch. Pharm. Res.* 1991, 14 (4), 295-297.

Jayaseelan, C.; Rahuman, A.A.; Rajakumar, G.; Kirthi, A.V.; Santhoshkumar, T.; Marimuthu, S. Synthesis of pediculocidal and larvicidal silver nanoparticles by leaf extract from heart leaf moon seed plant *Tinospora cordifolia* Miers. *Parasitol. Res.* 2011, 109, 185–194.

Jeulin, C.; Soufir, J.C.; Weber, P.; Laval-Martin, D.; Calvayrac, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 1989, 24, 185–196.

Jha, A.K.; Prasad, K.; Kulkarni, A.R. Plant system: Nature's nanofactory. *Colloids Surf. B* 2009, 73, 219–223.

Joergen, L.; Lars, P.C.; Tove, T. Acetylenes from roots of *Eryngium bourgatii*. *Phytochemistry.* 1992, 31 (8), 2881-2882.

Johnson, P.; Krishnan, V.; Loganathan, C.; Govindhan, K.; Raji, V.; Sakayanathan, P.; Vijayan, S.; Sathishkumar, P.; Palvannan, T. Rapid biosynthesis of *Bauhinia variegata* flower extract-mediated silver nanoparticles: an effective antioxidant scavenger and α -amylase inhibitor. *Art Cells Nanomed Biotechnol.* 2017, 46(7), 1488-1494.

Jung, U.J.; Lee, M.K.; Jeong, K.S.; Choi, M.S. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J. Nutr.* 2004, 134, 2499–2503.

Kabera, J.N.; Semana, E.; Mussa, A.R.; He, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J Pharma Pharmacol.* 2014, 2, 377-392.

Kale, A.; Bao, Y.; Zhou, Z.; Prevelige, P.E.; Gupta, A. Directed self-assembly of CdS quantum dots on bacteriophage P22 coat protein templates. *Nanotechnology.* 2013, 24, 045603.

Khaled, T.; Feras, Q.A.; Mohammad, G.; Mohammad, M.; Tamam, E.E. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 2007, 104 (4), 1372-1378.

Khan, H.; Ullah, H.; Tundis, R.; Belwal, T.; Devkota, H.P.; Daglia, M.; Cetin, Z.; Saygili, E.I.; Campos, M.G.; Capanoglu, E.; Du, M.; Dar, P.; Xiao, J. Dietary Flavonoids in the Management of Huntington's Disease: Mechanism and Clinical Perspective. *EFood* 2020, 1(1), 38–52.

Kitada, M.; Xu, J.; Ogura, Y.; Monno, I.; Koya, D. Manganese Superoxide Dismutase Dysfunction and the Pathogenesis of Kidney Disease. *Frontiers in Physiology* 2020, 11, 755.

Kobayashi, M., Nikami, H., Morimatsu, M., Saito, M. Expression and localization of insulinregulatable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosci Lett.* 1996, 213(2), 103-106.

Kosuru, R.Y.; Roy, A.; Das, S.K.; Bera, S. Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? *Mol Nutr Food Res* 2018, 62(1).

Kou, L.; Bhutia, Y.D.; Yao, Q.; He, Z.; Sun, J.; Ganapathy, V. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Frontiers in Pharmacology* 2018, 9.

Kulkarni, N.; Muddapur, U. Biosynthesis of metal nanoparticles: A review. *J. Nanotechnol.* 2014, 2014, 510246.

Kumar, D.; Kumar, S.; Kohli, S.; Arya, R.; Gupta, J. Antidiabetic activity of methanolic bark extract of *Albizia odoratissima* Benth in alloxan induced diabetic albino mice. *Asian Pac J Trop Med* 2011, 4, 900-903.

Kumar, R.; Kumar, D.; Kuldip, S.; Sairam, K.; Hemalatha, S. Antidiabetic activity of alcoholic leaves extract of *Alangium lamarckii* Thwaites on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Asian Pac J Tropical Med* 2011, 904-909.

Kumar, R.; Patel, D.K.; Prasad, S.K.; Laloo, D.; Krishnamurthy, S.; Hemalatha, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. *Fitoterpia* 2012, 83(2), 395-401.

Kumar, S.; Kumar, V.; Prakash, O. Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Dillenia indica* (L.) leaves extract on alloxan induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med* 2011, 347-352.

Le Claire, E.; Schwaiger, S.; Banaigs, B.; Stuppner, H.; Gafner, F. Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other Apiaceae. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4367-4372.

Le Vay, D. Anatomía y Fisiología Humana. 2008. Editorial Paidotribo.

Li, J.H.; Wang, W.; Huang, X.R. Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am J Pathol* 2004, 164, 1389–1397.

Li, S.; Li, J.; Guan, X.L.; Li, J.; Deng, S.P.; Li, L.Q. Hypoglycemic effects and constituents of the barks of *Cyclocarya paliurus* and their inhibiting activities to glucosidase and glycogen phosphorylase. *Fitoterapia* 2011, 82, 1081-1085.

Li, W.; Maloney, R.E.; Aw, T.Y. High glucose, glucose fluctuation and carbonyl stress enhance brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Implications for diabetic cerebral microvasculature. *Redox Biology*. 2015, 5, 80-90.

Li, X.; Wang, H.; Wen, G.; Li, L.; Gao, Y.; Zhuang, Z.; Zhou, M.; Mao, L.; Fan, Y. Neuroprotection by quercetin via mitochondrial function adaptation in traumatic brain injury: PGC-1 α pathway as a potential mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 2018, 22, 883–891.

Lin, C.H.; Chen, C.H.; Lin, Z.C.; Fang, J.Y. Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers. *J. Food Drug Anal.* 2017, 25, 219–234.

Lorenzo, P.; Moreno, A.; Lizasoain, I.; Leza, J.C.; Moro, M.A.; Portolés, A. Velázquez Farmacología Básica y Clínica. 2015. Editorial Médica Panamericana.

Maensiri, S.; Laokul, P.; Klinkaewnarong, J.; Phokha, S.; Promarak, V.; Seraphin, S. Indium oxide (In₂O₃) nanoparticles using Aloe vera plant extract: Synthesis and optical properties. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 2008, 10, 161–165.

Mahendran, S.; Badami, S.; Maithili, V. Evaluation of antidiabetic effect of embelin from *Embelia ribes* in alloxan induced diabetes in rats. *Biomed Preventive Nutr.* 2011, 1, 25-31.

Malik, P.; Shankar, R.; Malik, V.; Sharma, N.; Mukherjee, T.K. Green chemistry based benign routes for nanoparticle synthesis. *J. Nanopart.* 2014, 2014, 302429.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy C.; Jiménez, L. “Polyphenols: Food Sources and Bioavailability.” *Am J Clin Nutr.* 2004, 79 (5), 727-747.

Mansuri, M.L.; Parihar, P.; Solanki, I.; Parihar, M.S. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr.* 2014, 9, 400.

Marshall, A.T.; Haverkamp, R.G.; Davies, C.E.; Parsons, J.G.; Gardea-Torresdey, J.L.; van Agterveld, D. Accumulation of gold nanoparticles in Brassica juncea. *Int. J. Phytoremed.* 2007, 9, 197–206.

Meliani, N.; Amine Dib, M.E.; Allali, H.; Tabti, B. Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011, 6, 468-471.

Mergenthaler, P; Lindauer, U; Dienel, G.A.; Meisel, A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Cell Press* 2013, XXX, 1-11.

Mittal, A.K.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Synthesis of metallic nanoparticles using plants. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31, 346–356.

Moldovan, B.; David, L.; Achim, M.; Clichici, S.; Filip, G.A. A green approach to phytomediated synthesis of silver nanoparticles using *Sambucus nigra* L. fruits extract and their antioxidant activity. *J Mol Liq.* 2016.

Moreira, P.I; Rolo, A.P.; Sena, C.; Seïça, R.; Oliveira, C.R.; Santos, M.S. Insulin Attenuates Diabetes-Related Mitochondrial Alterations: A Comparative Study. *Med Chem.* 2006, 2, 299-308.

Morre, D.M.; Lenaz, G.; Morre, D.J. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol.* 2000, 203, 1513–1521.

Moreno, B.; Gargallo, M.A.; López de la Torre, M. Diagnóstico y Tratamiento en Enfermedades Metabólicas. 1997. Editorial Díaz de Santos.

Muckensturm, B.; Boulanger, A.; Farahi, M.; Reduron, J.P. Secondary metabolites from *Eryngium* species. *Nat. Prod. Res.* 2010, 24 (5), 391-397.

Muller, F.L.; Liu, Y.; Remmen, H.V. Complex III releases superoxide to both side of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004, 279, 49064-49073.

Mulvihill, J.J.E.; Cunnane, E.M.; Ross, A.M.; Duskey, J.T.; Tosi, G.; Grabrucker, A.M. Drug delivery across the blood–brain barrier: recent advances in the use of nanocarriers. *Nanomedicine (London)* 2020, 15(2), 205-214.

Muriach, M.; Flores-Bellver, M.; Romero, F.J.; Barcia, J.M. Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. *Oxid Med Cell Long.* 2014, 102158.

Nabavi, S.M.; Ebrahimzadeh, M.A.; Nabavi, S.F.; Jafari, M. Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of *Eryngium caucasicum* trautv and *Froripia subpinnata*. *Pharmacology.* 2008, (3), 19-25.

Nagajyothi, P.C.; Cha, S.J.; Yang, I.J.; Sreekanth, T.V.M.; Kim, K.J.; Shin, H.M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Polygala tenuifolia* root extract. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2015, 146, 10–17.

Nagalski, A.; Kozinski, K.; Wisniewska, M.B. Metabolic pathways in the periphery and brain: contribution to mental disorders? *The International J Biochem Cell Biol.* 2016, 80, 19-30.

Nairaimathi, K.L.; Sudha, V.; Lavanya, R.; Brindha, P. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities. *Colloid Surf. B* 2012, 88, 34–39.

Narayanan, K.B.; Sakthivel, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Mater. Lett.* 2008, 62, 4588–4590.

Naskar, S.; Mazumder, U.K.; Pramanik, G.; Gupta, M.; Sureshkumar, R.B.; Bala, A. Evaluation of antihyperglycemic activity of *Cocos nucifera* Linn. on streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2011, 138, 769-773.

Newman, J.; Rockman, C.; Kosiborod, M.; Guo, Y.; Zhong, H.; Weintraub, H.; Schwartzbard, A.; Adelman, M.; Berger, J. Diabetes Mellitus is a Coronary Heart Disease Risk Equivalent for Peripheral Vascular Disease. *Am Heart J.* 2016, 184, 114-120.

Newsholme, P.; Haber, E.P.; Hirabara, S.M.; Rebelato, E.L.O; Procopio, J; Morgan, D; Oliveira-Emilio, H.C.; Carpinelli, A.R.; Curi, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol.* 2007, 583.1, 9–24.

Nicolaou, K.C.; Chen, J.S.; Corey, E.J. *Classics in Total Synthesis. Further Targets, Strategies, Methods.* 2011. Weinheim: Wiley-VCH.

Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.A.; Beebe, D.; Oates, P.J.; Hammes, H.P.; Giardino, I.; Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000, 404, 787–790.

Nizamutdinova, I.T.; Jin, Y.C.; Chung, J.I.; Shin, S.C.; Lee, S.J.; Seo, H.G.; Kim, H.J. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, 53, 1419–1429.

Noble, J.A. Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015, 64, 101–112.

Noh, H.; King, G.L. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Int Soc Nephrol.* 2007.

Noriega-Cisneros, R.; Ortiz-Ávila, O.; Esquivel-Gutiérrez, E.; Clemente-Guerrero, M.; Manzo-Avalos, S.; Salgado-Garciglia, R.; Cortés-Rojo, C.; Boldogh, I.; Saavedra-Molina, A. Hypolipidemic Activity of *Eryngium carlinae* on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochem Res Int.* 2012.

Noriega-Cisneros, R.; Peña-Montes, D.J.; Huerta-Cervantes, M.; Torres-Martínez, R.; Huerta, M.; Manzo-Avalos, S.; Salgado-Garciglia, R.; Saavedra-Molina, A. *Eryngium carlinae* Ethanol Extract Corrects Lipid Abnormalities in Wistar Rats with Experimental Diabetes. *J Med Food*. 2019, 1–7.

Oboh, G.; Oyeleye, S.; Akintemi, O.; Olasehinde, T. *Moringa oleifera* supplemented diet modulates nootropic-related biomolecules in the brain of STZ-induced diabetic rats treated with acarbose. *Metab Brain Dis* 2018, 33, 457-466.

Ohadoma, S.C.; Michael, H.U. Effects of co-administration of methanol leaf extract of *Catharanthus roseus* on the hypoglycemic activity of metformin and glibenclamide in rats. *Asian Pac J Trop Med*. 2011, 475-477.

Ortiz-Avila, O.; Sámano-García, C.A.; Calderón-Cortés, E.; Pérez-Hernández, I.H.; Mejía-Zepeda, R.; Rodríguez-Orozco, A.R.; Saavedra-Molina, A.; Cortés-Rojo, C. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2013, 45, 271–287.

Ott, C.; Jacobs, K.; Haucke, E.; Navarrete Santos, A.; Grune, T.; Simm, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014, 2, 411-429.

Park, E.S.; Moon, W.S.; Song, M.J.; Kim, M.N.; Chung, K.H.; Yoon, J.S. “Antimicrobial Activity of Phenol and Benzoic Acid Derivatives.” *Int Biodeterior Biodegrade*. 2001, 47(4), 209-14.

Patel, D.K.; Kumar, R.; Prasad, S.K.; Sairam, K.; Hemalatha, S. Antidiabetic and in vitro antioxidant potential of *Hybanthus enneaspermus* (Linn) F. Muell in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med*. 2011, 4, 316-322.

Patil, R.; Patil, R.; Ahirwar, B.; Ahirwar, D. Isolation and characterization of anti-diabetic component (bioactivity guided fractionation) from *Ocimum sanctum* L. (Lamiaceae) aerial part. *Asian Pac J Trop Med*. 2011, 278-282.

Peña-Montes, D.; Huerta-Cervantes, M.; Ríos-Silva, M.; Trujillo, X.; Huerta, M.; Noriega-Cisneros, R.; Salgado-Garciglia, R.; Saavedra-Molina, A. Protective Effect of the Hexanic Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences In Vitro, in Yeast, and in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Antioxidants*. 2019, 8, 73.

Pérez-Ramírez, I.F.; Enciso-Moreno, J.A.; Guevara-González, R.G.; Gallegos-Corona, M.A.; Loarca-Piña, G.; Reynoso-Camacho, R. Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *J Funct Foods*. 2016, 20, 545–555.

Podsędek, A.; Majewska, I.; Redzynia, M.; Sosnowska, D.; Koziółkiewicz, M. *In vitro* Inhibitory Effect on Digestive Enzymes and Antioxidant Potential of Commonly Consumed Fruits. *J. Agric. Food Chem*. 2014, 62, 20, 4610–4617.

Poongothai, K.; Ponmurugan, P.; Syed Zameer Ahmed, K.; Senthil Kumar, B.; Sheriff, S.A. Antihyperglycemic and antioxidant effects of *Solanum xanthocarpum* leaves (field grown & in vitro raised) extracts on alloxan induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med.* 2011, 778-785.

Prabhu, S.; Vinodhini, S.; Elenchezhiyan, C.; Rajeswari, D. Evaluation of antidiabetic activity of biologically synthesized silver nanoparticles (AgNPs) using *Pouteria sapota* on STZ-induced diabetic rats. *J Diabetes* 2017, 10(1), 28-42.

Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 1999, 269, 337–341.

Raha, S.; Robinson, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000, 25, 222–230.

Raza, H.; John, A.; Howarth, F.C. Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Zucker Diabetic Rat Liver and Brain. *Cell Physiol Biochem.* 2015, 35, 1241-1251.

Reaven, G.M.; Greenfield, M.S. Diabetic hypertriglyceridemia: evidence for three clinical syndromes. *Diabetes* 1981, 30(2), 66-75.

Rieux, A.D.; Pourcelle, V.; Cani, P.D.; Marchand-Brynaert, J.; Pr at, V. Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 833–844.

Sales, P.M.; Souza, P.M.; Simeoni, L.A.; Silveira, D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci.* 2012, 15(1), 141-83.

Sandoval-Acuña, C.; Ferreira, J.; Speisky, H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014, 559, 75–90.

Sancheti, S.; Sancheti, S.; Seo, S.Y. Antidiabetic and antiacetylcholinesterase effects of ethyl acetate fraction of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne fruits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2011, 65(1-2), 55-60.

Satyavani, K.; Ramanathan, T.; Gurudeekan, S. Green synthesis of silver nanoparticles using stem dried callus extract of bitter apple (*Citrullus colocynthis*). *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 2011, 6, 1019–1024.

Sattar, E.A.; Elberry, A.A.; Harraz, F.M.; Ghareib, S.A.; Nagy, A.A.; Gabr, S.A. Antihyperglycemic and hypolipidaemic effects of the methanolic extract of Saudi mistletoe (*Viscum schimperii* Engl.). *J Adv Res.* 2011, 2, 171-177.

Savithramma, N., Linga Rao, M., and Suhrulatha, D. "Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites." *Middle-East J. Sci. Res.* 2011, 8, 579-84.

Sazanov, L.A. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 2007, 46, 2275–2288.

Sickmann, H.M., Walls, A.B., Schousboe, A., Bouman, S.D., Waagepetersen, H.S. Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem.* 2009, 109, 80-86.

Sefi, M.; Fetoui, H.; Lachkar, N.; Tahraoui, A.; Lyoussi, B.; Boudawara, T. *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *J Ethnopharmacol.* 2011, 135, 243-250.

Shah, M.; Fawcett, D.; Sharma, S.; Tripathy, S.K.; Poinern, G.E.J. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials* 2015, 8, 7278–7308.

Shanker, K.; Naradala, J.; Mohan, G.K.; Kumar, G.S.; Pravallika, P.L. A sub-acute oral toxicity analysis and comparative in vivo anti-diabetic activity of zinc oxide, cerium oxide, silver nanoparticles, and *Momordica charantia* in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *RSC Adv.* 2017, 7, 37158.

Sharma, S.; Mishra, V.; Kumar, S.; Srivastava, N. Effect of *Trigonella foenum graecum* L on the Activities of Antioxidant Enzyme and Their Expression in Tissues of Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2015, 20(3), 203-11.

Sharma, V.; Verma, D.; Okram, G.S. Influence of surfactant, particle size and dispersion medium on surface plasmon resonance of silver nanoparticles. *J. Phys. Condens. Matter* 2020, 32, 145302.

Silva, L.P.; Pereira, T.N.; Bonatto, C.C. Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* 2019, 137-164.

Sims, N.R. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* 1990, 55, 698–707.

Singh, A.; Jain, D.; Upadhyay, M.K.; Khandelwal, N.; Verma, H.N. Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activity. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 2010, 5, 483–489.

Singleton, V.L. y Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965, 16, 144-158.

Sireesh, Y.; Kasetti, R.B.; Nabi, S.A.; Swapna, S.; Apparao, C. Antihyperglycemic and hypolipidemic activities of *Setaria italica* seeds in STZ diabetic rats. *Pathophysiology*. 2011, 18, 159-164.

Sivitz, W.I y Yorek, M.A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010, 12(4), 537-577.

Skulachev, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1363, 100–124.

Sonawane, R.D.; Vishwakarma, S.L.; Lakshmi, S.; Rajani, M.; Padh, H.; Goyal, R.K. Amelioration of STZ-induced type 1 diabetic nephropathy by aqueous extract of *Enicostemma littorale* Blume and swertiamarin in rats. *Mol Cell Biochem*. 2010, 340, 1-6.

Souto, E.B.; Souto, S.B.; Campos, J.R.; Severino, P.; Pashirova, T.N.; Zakharova, L.Y.; Silva, A.M.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Izzo, A.A.; Santini, A. Nanoparticle Delivery Systems in the Treatment of Diabetes Complications. *Molecules* 2019, 24, 4209.

St-Pierre, J.; Buckingham, J.A.; Roebuck, S.J.; Brand, M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002, 277, 44784–44790.

St-Pierre, J.; Drori, S.; Uldry, M.; Silvaggi, J.M.; Rhee, J.; Jager, S.; Handschin, C.; Zheng, K.; Lin, J.; Yang, W.; Simon, D.K.; Bachoo, R.; Spiegelman, B.M. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006, 127, 397-408.

Sulaiman, M. Diabetic nephropathy: recent advances in pathophysiology and challenges in dietary management. *Diabetol Metab Syndr*. 2019, 11:7.

Suleiman, A.K. Phytochemistry of *Eryngium creticum*. *Alexandria J. Pharm. Sci*. 1994, 8 (1), 73-75.

Sundaram, R.; Naresh, R.; Shanthi, P.; Sachdanandam, P. Antihyperglycemic effect of iridoid glucoside, isolated from the leaves of *Vitex negundo* in streptozotocin-induced diabetic rats with special reference to glycoprotein components. *Phytomedicine* 2012, 19(3-4), 211-216.

Sunil, C.; Ignacimuthu, S.; Agastian, P. Antidiabetic effect of *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) S. Moore. in type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2011, 134, 298-304.

Swami, A.; Selvakannan, P.R.; Pasricha, R.; Sastry, M. One-step synthesis of ordered two dimensional assemblies of silver nanoparticles by the spontaneous reduction of silver ions by pentadecylphenol Langmuir monolayers. *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 19269–19275.

Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiología Vegetal*. 2006. Editorial Universitat Jaume.

Taskinen, M.R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003, 46, 733-749.

Tébar, F.J.; Escobar, F. *La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica*. 2009. Editorial Médica Panamericana.

Teixeira, J.; Deus, C.M.; Borges, F.; Oliveira, P.J. Mitochondria: Targeting mitochondrial reactive oxygen species with mitochondrion tropic polyphenolic-based antioxidants. *International J Biochem Cell Biol*. 2018, 97, 98–103.

Tennant, K.A.; Brown, C.E. Diabetes augments in vivo microvascular blood flow dynamics after stroke. *The Journal of neuroscience: J Soc Neurosci*. 2013, 33(49), 19194-19204.

Thakar, J.H.; Hassan, M.N. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), cyperquat (MPP+) and paraquat on isolated mitochondria from rat striatum cortex and liver. *Life Sci*. 1988, 43, 143–149.

Thakkar, K.N.; Mhatre, S.S.; Parikh, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanotechnol. Biol. Med. Nanomed*. 2010, 6, 257–262.

Thirumalai, T.; Therasa, V.S.; Elumalai, E.K.; David, E. Hypoglycemic effect of *Brassica juncea* (seeds) on streptozotocin induced diabetic male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011, 4, 323-325.

Thorens, B.; Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010, 298, E141–E145.

Truong Tuyet, M.; Nghiem Nguyet, T.; Pham Gia, T.; Nguyen, V.C. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 2007, 53 (3), 267-276.

Valsecchi, A.E.; Franchi, S.; Panerai, A.E.; Rossi, A.; Sacerdote, P.; Colleoni, M. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur. J. Pharmacol*. 2011, 650, 694–702.

Vankar, P.S.; Bajpai, D. Preparation of gold nanoparticles from *Mirabilis jalapa* flowers. *Indian J. Biochem. Biophys*. 2010, 47, 157–160.

Villalpando, M. y Rosas, G. Effect of Magnetic Stirring on the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Lavandula angustifolia* Plant Extract. *Microsc. Microanal*. 2019, 25 (Suppl 2), 1976-1977.

Villalpando, M.; Saavedra-Molina, A.; Rosas, G. A facile synthesis of silver nanowires and their evaluation in the mitochondrial membrane potential. *Materials Science & Engineering C*. 2020. 114, 110973, 1-7.

Vinik, A.; Flemmer, M. Diabetes and macrovascular disease. *J Diabetes Complications* 2002, 16(3), 235-245.

Violet, K.; Fatma, U.A.; Imad, H. Evaluation of the acute antihyperglycemic effects of four selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Pharm. Biol.* 2011, 49 (7), 687-695.

Vit, K.; Lubomir, O.; Eliska, B.; Zuzana, R.; Frantisek, C.; Katerina, K.; Kamil, K.; Daniel, J.; Miroslav, P.; Jiri, K. Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae. *J. Enzym. Inhib.* 2008, 23 (2), 218-224.

Wang, P.; Su, Z.; Yuan, W.; Deng, G.; Li, S: Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops* 2012, 3, 99-120.

Wang, W.; Lo, A. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1816.

Wells, L.; Vosseller, K.; Hart, G.W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 2001, 291, 2376–2378.

Wender, R., Brown, A.M., Fern, R., Swanson, R.A., Farrell, K., Ransom, B.R. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci* 2000, 20(18), 6804-6810.

Wolfe, E.A.; Sherwood, G.A.; Mitchell, K.A.; Browne, M.P. Antiinflammatory and analgesic properties from the stems of *Eryngium foetidum* (Shadow Benny). In *220th ACS National Meeting*, Washington, DC, United States, 2000.

Wong, S.P.; Leong, L.P.; Koh, J.H.W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 2006, 99 (4), 775-783.

Wright, E.M.; Loo, D.D.F.; Hirayama, B.A. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol Rev* 2011, 91, 733–794.

Yamakura, F. y Kawasaki, H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1804, 318–325.

Yan, S.F.; Ramasamy, R.; Schmidt, A.M. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med* 2009, 87, 235–247.

Yao, Q.; Choi, J.H.; Dai, Z.; Wang, J.; Kim, D.; Tang, X. Improving tumor specificity and anticancer activity of dasatinib by dual-targeted polymeric micelles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 36642–36654.

Yao, Q.; Dai, Z.; Hoon, C.J.; Kim, D.; Zhu, L. Building stable MMP2-responsive multifunctional polymeric micelles by an all-in-one polymer-lipid conjugate for tumor-targeted intracellular drug delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 32520–32533.

Yin, H.; Huang, L.; Ouyang, T.; Chen, L. Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2018, 55, 55–62.

Yuan, T.; Yang, T.; Chen, H.; Fu, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Yuan, Q.; Yu, H.; Xu, W.; Xie, X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biology* 2019, 20, 247–260.

Yun, Y.; Yong, W.C.; Park, K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2013, 65, 822–832.

Zhang, A.; Meng, K.; Liu, Y.; Pan, Y.; Qu, W.; Chen, D.; Xie, S. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanocarriers in vivo and their influences. *Advances in Colloid and Interface Science* 2020, 284, 102261.

Zhou, Z.; Xie, S.; Saw, W.; Ho, P.; Wang, H.; Lei, Z.; Yi, Z.; Tan, E. The therapeutic implications of tea polyphenols against dopamine (DA) neuron degeneration in Parkinson's disease (PD). *Cells* 2019, 8, 911.