



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“Efecto antioxidante del extracto etanólico de
Justicia spicigera en hígado de ratas diabéticas”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

MARINA MURILLO VILICAÑA

ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-ASESOR: QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

JOSÉ ALBERTO MARTÍNEZ MORA

MORELIA, MICHOACÁN, OCTUBRE del 2017

Este trabajo se realizó en laboratorio de Bioquímica del
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con el apoyo
económico parcial del donativo de la Coordinación de Investigación
Científica (2.16-2017).

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y esta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible”. Ray Bradbury.

Dedicatoria

A Dios que me ha regalado todo a cambio de nada, me ha amado y acompañado por este largo camino, pero sobre todo me ha enseñado que la vida no es fácil pero si muy bonita.

A mis padres José Luis y Trinidad que a pesar de todas las dificultades siempre me han apoyado. Ellos me han enseñado con el ejemplo que las acciones valen más que las palabras y que para lograr grandes cosas no solo basta soñar. Los quiero mucho.

A mis hermanos, en especial a mi hermana Mayra que me conoce como nadie más en el mundo, gracias por estar siempre que lo necesito y ayudarme a enfrentar mejor la vida. He aprendido tanto de ti y sabes que mis logros también son los tuyos.

A mis abuelitos y tías, que me quieren y escuchan como si fuera su hija y que a pesar de la distancia están siempre presentes en mi corazón. Lo que soy ahora es también gracias a ellos.

A mis amigos, que me brindaron la oportunidad de conocerlos y me han regalado un sinfín de momentos inolvidables. Son un pedacito de mi vida y toda mi alegría.

Agradecimientos

A mi asesor D. C. Alfredo Saavedra Molina, le agradezco de todo corazón la oportunidad que me brindó para realizar mi servicio social y trabajo de tesis en el laboratorio de Bioquímica, por todos los conocimientos, consejos y anécdotas que ha compartido conmigo y por el apoyo y aliento incondicionales que me ha dado para seguir adelante. Es usted un ejemplo a seguir en mi vida. Muchas gracias.

A mi Co asesor Q. F. B. José Alberto Martínez Mora, por aceptar la responsabilidad de enseñarme el mundo de la investigación, por la disciplina, comentarios, ayuda y especialmente por la amistad y confianza que hicieron mi estancia en el laboratorio más agradable. Es por todo esto que puedo lograr uno de mis mayores sueños y en verdad te lo agradezco.

A la D. C. Ruth Noriega Cisneros, le agradezco por todo el tiempo que dedicó en resolver muchas de mis dudas, la paciencia y espacio que me prestó en su laboratorio y por estar siempre disponible cuando la necesité aunque no era su obligación, usted terminó siendo una de las personas más importantes para el desarrollo de mi tesis. Mil gracias por todo.

A Mónica Clemente Guerrero, técnica del laboratorio, por su apoyo incondicional en todo momento durante el desarrollo de mi tesis.

Reconocimiento



A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, de la cual soy egresada. Me llena de orgullo decirme Nicolaita y tomar la responsabilidad de poner en alto su nombre.

A la Facultad de Químico Farmacobiología, por mi formación académica y personal.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, particularmente al laboratorio de Bioquímica donde realicé mi trabajo de tesis y donde mis sueños empezaron a tomar forma.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal que está a cargo del D. C. Rafael Salgado Garciglia.

Marina Murillo Villicaña

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADP	Adenosín difosfato
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
CAT	Catalasa
CoA	Coenzima A
CTE	Cadena transportadora de electrones
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENSANUT	Encuesta nacional de nutrición
EO	Estrés oxidativo
EJS	Extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FID	Federación Internacional de la Diabetes
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GLUT	Transportadores de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa

Abreviatura	Significado
GSH	Glutación reducido
GSH-Rd	Glutación reductasa
GSSH	Glutación oxidado
GS	Glutamato sintetasa
GST	Glutación-S-transferasa
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPL	Lipoproteína de baja densidad
MIA PaCa	Líneas celulares de cáncer pancreático
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAFLD	Esteatosis hepática no alcohólica (Non-alcoholic fatty liver disease)
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica (Non-alcoholic steato hepatitis)
NEFA	Ácidos grasos no esterificados (Non-esterified fatty acid)
OMS	Organización Mundial de la Salud

Abreviatura	Significado
REL	Retículo endoplasmático liso
RL	Radicales libres
SGLT	Transportador de glucosa ligado a sodio (Sodium Glucose Contransporter)
SOD	Superóxido dismutasa
SOG	Sobrecarga oral de glucosa
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
STZ-NDA	Estreptozotocina-nicotinamida
TGO	Transaminasa glutámica oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

ÍNDICE GENERAL I

1.0 RESUMEN.....	1
2.0 ABSTRACT.....	3
3.0 INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Antecedentes.....	6
3.2 Diabetes mellitus.....	8
3.2.1 Definición, causas, síntomas y riesgos.....	8
3.2.2 Clasificación y diagnóstico.....	9
3.2.3 Estadísticas actuales de la Diabetes a nivel mundial y en México.....	11
3.3 Transportadores de glucosa (GLUT).....	13
3.3.1 Órganos insulino dependientes y órganos no insulino dependientes.....	13
3.4 Anatomía del hígado.....	14
3.4.1 Funciones del hígado.....	16
3.4.2 Metabolismo de carbohidratos.....	16
3.4.2.1 Gluconeogénesis.....	16
3.4.3 Excreción de bilirrubina.....	16
3.4.4 Regeneración hepática.....	17
3.5 Hígado y diabetes.....	17
3.6 Pruebas de función hepática.....	19
3.6.1 Pruebas indicadoras de necrosis.....	20
3.6.1.1 Transaminasas: Alanina amino transferasa (ALT), Aspartato amino transferasa (AST).....	20
3.6.1.2 Lactato deshidrogenasa (LDH).....	20

3.6.2 Pruebas indicadoras de colestasis.....	21
3.6.2.1 Fosfatasa alcalina (FA).....	21
3.6.2.2 Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT).....	21
3.6.3 Pruebas metabólicas.....	21
3.6.3.1 Bilirrubina.....	21
3.7 Metabolismo de lípidos.....	22
3.7.1 Hidrólisis de los triglicéridos.....	22
3.8 Lípidos hepáticos.....	23
3.9 Perfil de lípidos.....	23
3.9.1 Colesterol.....	23
3.9.2 Triglicéridos.....	24
3.9.3 Lipoproteínas.....	25
3.9.3.1 Lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	25
3.9.3.2 Lipoproteínas de baja densidad (LDL).....	25
3.9.3.3 Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).....	26
3.10 La mitocondria.....	26
3.10.1 Hiperglucemia y el mal funcionamiento de la mitocondria.....	27
3.10.2 Cadena transportadora de electrones.....	28
3.11 Especies reactivas de oxígeno.....	29
3.11.1 Características de las especies reactivas de oxígeno.....	29
3.11.2 Generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.....	30
3.12 Relación de la diabetes con el estrés oxidativo.....	31
3.13 Antioxidantes y tipos de antioxidantes.....	32

3.13.1 Antioxidantes endógenos.....	33
3.13.2 Moléculas antioxidantes.....	33
3.13.2.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	33
3.13.2.2 Catalasa (CAT).....	34
3.13.2.3 Glutación (GSH).....	34
3.13.2.4 Glutación reductasa (GSH-Rd).....	36
3.13.2.5 Metabolismo de glutación.....	36
3.13.3 Antioxidantes exógenos.....	37
3.13.3.1 Polifenoles.....	37
3.13.3.2 Vitaminas.....	37
3.14 Las plantas como antioxidantes.....	38
3.15 <i>Justicia spicigera</i> Schechtendal.....	39
3.15.1 Botánica de <i>Justicia spicigera</i>	40
3.15.2 Usos de <i>Justicia spicigera</i> en la medicina tradicional Mexicana.....	41
3.15.3 Estudio fitoquímico de <i>Justicia spicigera</i>	41
4.0 Justificación.....	44
5.0 Hipótesis.....	44
6.0 Objetivo general.....	44
6.1 Objetivos específicos.....	44
7.0 Diseño experimental.....	45
8.0 Materiales y métodos.....	46
8.1 Identificación y recolección de la planta <i>Justicia spicigera</i>	46
8.2 Obtención del extracto etanólico de las hojas de <i>Justicia Spicigera</i>	46

8.3 Animales.....	46
8.3.1 Inducción a la diabetes.....	46
8.3.2 Determinación de los niveles de glucemia y peso durante el tratamiento.....	47
8.3.3 Registro de la ingesta de alimento y agua durante el tratamiento.....	47
8.3.4 Evaluación de las muestras sanguíneas.....	47
8.3.4.1 Cuantificación de los parámetros de perfil de lípidos.....	48
8.3.4.2 Determinación de los parámetros de función hepática.....	48
8.4 Aislamiento de mitocondrias de hígado.....	48
8.5 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial.....	49
8.6 Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa.....	49
8.7 Determinación de los niveles de glutatión total, reducido y oxidado.....	49
8.8 Determinación de la enzima catalasa en homogenado de hígado.....	50
9.0 RESULTADOS.....	51
9.1 Establecimiento del modelo diabético.....	51
9.1.1 Glucemia.....	51
9.1.2 Peso corporal.....	52
9.1.3 Agua.....	52
9.1.4 Alimento.....	53
9.2 Perfil de lípidos.....	53
9.2.1 Colesterol total, colesterol HDL e índice aterogénico.....	55
9.2.2 Colesterol de baja densidad (LDL).....	55
9.2.3 Colesterol de muy baja densidad (VLDL), triglicéridos y lípidos totales.....	55

9.3 Perfil hepático.....	55
9.3.1 Proteínas totales.....	57
9.3.2 Bilirrubinas.....	57
9.3.2.1 Bilirrubina total.....	57
9.3.2.2 Bilirrubina directa.....	57
9.3.2.3 Bilirrubina indirecta.....	57
9.3.3 Fosfatasa alcalina.....	58
9.3.4 Gamma glutamil transferasa (GGT).....	58
9.3.5 Deshidrogenasa láctica (DHL).....	58
9.3.6 Aspartato amino transferasa (AST).....	58
9.3.7 Alanino amino transferasa (ALT).....	59
9.4 Peso del hígado.....	59
9.5 Actividad de la superóxido dismutasa en mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	60
9.6 Niveles de glutatión en mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas y Diabéticas.....	61
9.7 Determinación de la enzima Catalasa (CAT) en homogenado de hígado de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	61
10.0 DISCUSIÓN.....	62
11.0 RESUMEN DE RESULTADOS.....	68
12.0 CONCLUSIÓN.....	68
13.0 PERSPECTIVAS.....	69
14.0 REFERENCIAS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS II

Figura 1. Cara anterosuperior o diafragmática del hígado.....	14
Figura 2. Cara posteroinferior o visceral.....	15
Figura 3. Cara posterior del hígado.....	15
Figura 4. Estructura interna de la mitocondria.....	27
Figura 5. Flor de <i>Justicia spicigera</i>	35
Figura 6. Distribución geográfica de <i>Justicia spicigera</i>	39
Figura 7. Parte aérea completa de <i>Justicia spicigera</i>	40
Figura 8. Hojas y flor de <i>Justicia spicigera</i>	41
Figura 9. Estructura química del kaempferol.....	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS III

Gráfica 1. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> a 100 mg/kg después de la administración de glucosa (2 g/kg) en ratas macho de la cepa Wistar inducidas con STZ-NDA.....	7
Gráfica 2. Concentraciones de glucemia durante el tratamiento con extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg).....	51
Gráfica 3. Porcentaje de actividad de la SOD en ratas tratadas con el extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) durante 30 días.....	60
Gráfica 4. Actividad de la catalasa en homogenado de hígado de ratas tratadas con el extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) durante 30 días.....	62

ÍNDICE DE TABLAS IV

Tabla 1. Efecto hipoglucémico de la administración oral del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> a 10, 50 y 100 mg/kg en ratas normoglucémicas.....	6
Tabla 2. Clasificación de la diabetes mellitus.....	9
Tabla 3. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus.....	10
Tabla 4. Principales países con mayor prevalencia de diabetes mellitus.....	11
Tabla 5. Países con mayor prevalencia de diabetes tipo 1 en niños.....	12
Tabla 6. Principales causas de muerte en México.....	13
Tabla 7. Taxonomía de <i>Justicia spicigera</i>	39
Tabla 8. Porcentaje de ganancia de peso al término de la administración oral del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) durante 30 días.....	52
Tabla 9. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) sobre el consumo de agua y alimento al término de la administración oral por 30 días.....	53
Tabla 10. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) sobre el perfil lipídico al término de la administración durante 3 días.....	54
Tabla 11. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) en la determinación del índice aterogénico al término de la administración durante 30 días.....	54
Tabla 12. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) sobre el perfil hepático al término de la administración durante 30 días.....	56
Tabla 13. Porcentaje de peso del hígado de ratas tratadas con el extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) durante 30 días.....	59
Tabla 14. Niveles de glutatión en hígado de ratas tratadas con el extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (100 mg/kg) durante 30 días.....	61

1.0 Resumen

El estrés oxidativo (EO) es un factor que contribuye al desarrollo de complicaciones en la diabetes sin embargo, sus efectos pueden ser contrarrestados mediante el uso de antioxidantes exógenos, los cuales encontramos en algunas plantas. Es por ello, que las personas recurren a la medicina tradicional para el tratamiento terapéutico de esta enfermedad. Se ha demostrado que *Justicia spicigera* (*J. spicigera*) posee la capacidad de disminuir los niveles de glucemia; sin embargo no han sido reportados sus efectos en órganos no insulino dependientes como el hígado. Por lo anterior, la presente investigación está dirigida a la determinación de la capacidad antioxidante de esta planta y sus efectos sobre las funciones hepáticas en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ). Se eligieron ratas de la cepa Wistar con un peso entre 380-400 g las cuales fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos. Grupo 1: Control normoglucémico (DMSO); Grupo 2: Control diabético (DMSO); Grupo 3: Normoglucémico + extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg); Grupo 4: Diabético + extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg). Durante la administración del extracto que fue durante 30 días se tomaron los datos de glucemia y peso cada 5 días. Concluido el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, a partir de las muestras sanguíneas se determinó en suero las pruebas de perfil de lípidos y función hepática. En las mitocondrias de hígado aisladas empleando la técnica descrita por Saavedra-Molina y Devlin (1997), se llevo a cabo la determinación del antioxidante enzimático superóxido dismutasa (SOD) y no enzimático glutatión (GSH), mientras que del homogenado del órgano aislado se evaluó la actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT). En los resultados se observó que el peso corporal, glucosa en sangre, colesterol-Very Low Density Lipoprotein (VLDL), triglicéridos, lípidos totales y perfil hepático alterados en la condición diabética, fueron normalizados con la administración del extracto etanólico de *J. spicigera* (EJS), por otro lado, la función enzimática de la SOD en mitocondrias no genera cambios significativos en el grupo diabético control, sin embargo mostró menor actividad con la administración del extracto en la condición diabética y un aumento en ratas normoglucémicas administradas, mientras que CAT presentó un aumento significativo en ratas diabéticas control y una disminución en su actividad con la administración del extracto, sin presentar efecto en ratas normoglucémicas. Además se muestra una tendencia a aumentar la relación GSH/GSSG y disminuir los niveles de

glutación total en ratas diabéticas tratadas. En conclusión; se considera que el EJS redujo el estrés oxidativo en hígado, disminuyendo el daño al hepatocito en ratas diabéticas inducidas con STZ.

Palabras clave: *Justicia spicigera*; EJS; estrés oxidativo; diabetes; efecto antioxidante.

2.0 Abstract

The oxidative stress is a factor that contributes to the development of complications in the diabetes disease however; its effects can be counteracted by the use of exogenous antioxidants, which are found in some plants. That is why people look to the traditional medicine in search of the therapeutic treatment. *Justicia spicigera* has been demonstrate to have the capacity of reduce glucemia levels; nevertheless the effects in non-insulin dependents organs like the liver, has not been reported. For that reason, the present investigation it is aimed to determining the anti-oxidizing capacity in this plant, and their effects in the hepatic functions of diabetic rats, that were induced with estreptozotocina (STZ). The selected rats were from Wistar straine, with a weight between 380-400 gr. Moreover, was randomly divided in 4 groups. Group 1: normogluccemic (DMSO); Group 2: Dibetic (DMSO); Group 3: Normogluccemic + ethanolic extract of *J. Spicigera* (100 mg/kg); Group 4: Diabetic + ethanolic extract of *J. Spicigera* (100 mg/kg). During administration of the extract that was for 30 days, the blood glucose and weight data were taken every 5 days. Once the treatment concludes, the rats were sacrificed by beheading; from blood samples were determined in serum lipid profile tests and liver function. In the mitochondria of liver isolated using the technique described by Saavedra-Molina & Devlin (1997) was determined of the enzymatic antioxidant superoxide dismutase (SOD) and non-enzymatic Glutathione (GSH); in addition, the homogenate of this organ was obtained to evaluate the activity of the enzyme antioxidant Catalase (CAT). The corporal weight, blood glucose, cholesterol-Very Low Density Lipoprotein (VLDL), triglycerides, total lipids and liver profile; was changed in the diabetic condition and normalized with the application of ethanolic extract of *J. Spicigera* (EJS). On the other hand, the enzymatic function of SOD in mitochondria does not generate significant changes in the control diabetic group, nevertheless, a minor activity was shown in the diabetic condition with the administration of the extract, and increase in normogluccemic rats. Meanwhile CAT shown a significant growth in control diabetic rats and a decrease in their activity with the application of the extract, without present any effect in normogluccemic rats. There is also a tendency to increase the GSH/GSSG ratio and decrease total glutathione levels in diabetic rats administered. In conclusion, EJS is considered to reduce oxidative stress in liver, decrease hepatocyte damage in STZ-induced diabetic rats.

Keywords: *Justicia spicigera*; EJS; oxidative stress; diabetes; antioxidant effect.

3.0 Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto heterogéneo de síndromes de etiopatogenia multifactorial, donde el nexo común es el trastorno metabólico, fundamentalmente hiperglucemia crónica, alteraciones en el metabolismo lipídico y proteico. La DM es la enfermedad endocrina más frecuente y una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en la sociedad contemporánea **(Luque, 2011)**. La prevalencia de la DM está aumentando en todo el mundo y se considera un problema de salud pública. Actualmente, existen evidencias de que las complicaciones que se presentan en la DM (ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputación de piernas, pérdida de visión y daños neurológicos) **(OMS, 2016)** se deben principalmente a que se produce un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres (RL), que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa, provocando daño oxidativo a biomoléculas **(Ramos *et al.*, 2006)**. Dicho daño se puede evitar o disminuir con la administración de antioxidantes exógenos, lo que puede permitir a los pacientes con diabetes tener mejor calidad de vida, pues es de esperar que las complicaciones micro y macrovasculares ocasionadas principalmente por la producción excesiva de RL, disminuyan con la administración de antioxidantes. Cuando un exceso de radicales libres se forma, puede causar la destrucción de enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), generando efectos letales en las células por la oxidación de lípidos, proteínas y DNA; ocasionando reacciones en cadena que perpetúa la creación de más radicales libres aumentando el daño de tejidos **(Krishnaiah *et al.*, 2011)**. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y el establecimiento del estrés oxidativo (EO) afectan a una amplia variedad de funciones fisiológicas, participando en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico-degenerativas como impacto epidemiológico **(Sánchez-Valle, 2013)**. Estas enfermedades pueden generarse por pro-oxidantes que modifican el estado redox y alteran la tolerancia a la glucosa, favoreciendo el EO mitocondrial **(Luque, 2011)**. Todos los tipos de diabetes pueden provocar complicaciones en muchas partes del organismo e incrementar el riesgo general de muerte prematura.

Las enfermedades metabólicas como la DM, tienen grandes posibilidades de tener una participación de elementos oxidativos en su génesis, evolución o complicaciones ya que pueden generar estados oxidantes o afectar la generación o la eficiencia de recuperación de los mecanismos antioxidantes (Quintanar-Escorza *et al.*, 2009). Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones de transformación que causan daños a las biomoléculas. En los últimos años los antioxidantes naturales provenientes de plantas como el ácido ascórbico (vitamina C), α -Tocoferol (vitamina E), glutatión, carotenoides y flavonoides, han sido frecuentemente usados en diferentes campos de la industria farmacéutica, alimentos y en medicina (Karre *et al.*, 2013). Ya que las plantas poseen antioxidantes es que las personas utilizan para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el EO. Entre las plantas utilizadas para estos fines encontramos a *Justicia spicigera* (*J. spicigera*) que ha demostrado tener actividad hipoglucémica (Ortíz-Andrade *et al.*, 2012).

3.1 Antecedentes

Ortíz-Andrade *et al.* (2012), reportaron el efecto hipoglucémico del extracto etanólico de *J. spicigera* (EJS) en ratas normoglucémicas y diabéticas (Tabla 1). Le atribuyen este efecto a la estimulación de la captación de glucosa tanto en ratas sensibles como en ratas resistentes a la insulina, sin embargo, los efectos hipoglucémicos del extracto etanólico de *J. spicigera* podrían estar vinculados a más de un mecanismo como: (a) la modulación de la secreción de insulina y/o acción de la insulina, (b) la participación de un sistema antioxidante, (c) la mejora del metabolismo de la glucosa de las células β , (d) la activación de un sistema enzimático, o (e) que los fosfolípidos deriven un mensajero.

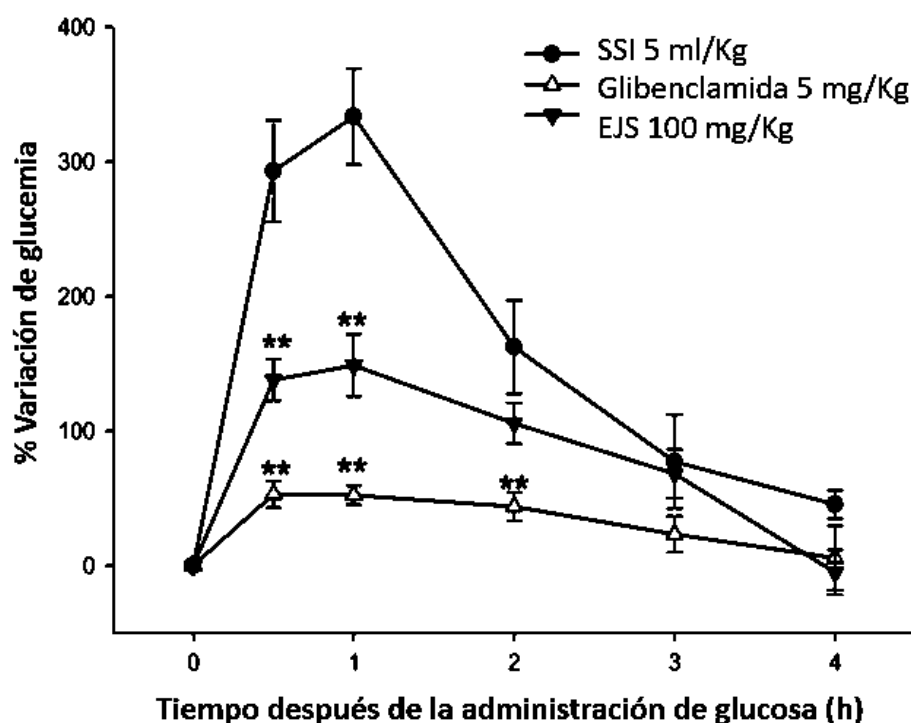
Tabla 1. Efecto hipoglucémico de la administración del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> (JSE a 10, 50 y 100 mg/kg) en ratas normoglucémicas. SSI: Solución salina isotónica.				
Tiempo (h)	SSI	Extracto etanólico de <i>J. spicigera</i>		
		10 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
0.5	69.99 $\pm$ 8.18	42.85 $\pm$ 5.55 ^a	40.14 $\pm$ 6.82 ^a	44.37 $\pm$ 5.03 ^a
1.0	102.46 $\pm$ 9.28	60.95 $\pm$ 5.06 ^a	64.68 $\pm$ 1.23 ^a	62.65 $\pm$ 7.39 ^a
2.0	59.53 $\pm$ 6.41	17.06 $\pm$ 6.41 ^a	12.90 $\pm$ 4.57 ^a	11.32 $\pm$ 5.50 ^a
3.0	16.94 $\pm$ 1.03	10.46 $\pm$ 5.20	8.30 $\pm$ 7.83	0.30 $\pm$ 4.25 ^a
4.0	32.24 $\pm$ 5.83	-5.41 $\pm$ 6.05 ^a	-12.22 $\pm$ 6.59 ^a	-9.17 $\pm$ 6.76 ^a

Para probar el efecto hipoglucémico de *J. spicigera* se administró a ratas normoglucémicas una solución de glucosa (2 g/kg) por vía oral y 10 min después se les administró el extracto etanólico de *Justicia spicigera* a dosis diferentes por grupo (10, 50 o 100 mg/kg). Los autores observaron que el EJS disminuyó significativamente la glucemia en las diferentes dosis desde los 30 min hasta las 4 h, pero debido a que sólo el EJS a 100 mg/kg ejerció diferencias significativas en los niveles de glucemia en todo momento en ratas normoglucémicas, se probó esta dosis en ratas diabéticas. El valor negativo indica la disminución de la glucemia comparada con el tiempo cero.

Los datos expuestos en la gráfica 1 son el porcentaje de variación de glucemia para cada grupo que se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = \frac{G_x - G_0}{G_0} \times 100$$

G_0 : Valores iniciales de glucemia
 G_x : Valores de glucemia en 0.5, 1, 2, 3 y 4 h.



Gráfica 1. Efecto del extracto etanólico de *Justicia spicigera* a 100 mg/kg después de la administración de glucosa (2 g/kg) en ratas macho de la cepa Wistar inducidas con STZ-NDA. Cada una de las mediciones representa la media del error estándar (n=5; ** $p < 0.001$).

En la prueba de tolerancia a glucosa, fueron administrados 3 grupos de ratas diabéticas en donde a un primer grupo se le administró solución salina isotónica, a un segundo glibenclamida como control positivo hipoglucémico y un tercer grupo el EJS a 100 mg/kg, 10 minutos después se les administró vía oral una dosis de 2 g/kg de glucosa. Las muestras biológicas se obtuvieron por punción de la vena caudal en tiempo 0 (antes de la administración de glucosa) y a los 0.5, 1, 2, 3 y 4 h después de la administración de glucosa. Los valores representados en la gráfica 1 son el porcentaje de variación de la glucemia que se obtuvo de la misma forma que el experimento anterior. Estos valores son representados en el eje de las Y de la gráfica donde podemos observar que el grupo administrado con solución salina isotónica (SSI) reflejó un aumento de más del 300% de variación de glucemia, mientras que el grupo diabético administrado con EJS 100 mg/kg alcanzó un 110% de variación de glucemia. A las 4 h el efecto del EJS disminuyó el porcentaje de variación de glucemia hasta los niveles normales.

3.2 Diabetes mellitus

3.2.1 Definición, causas, síntomas y riesgos

La DM es una enfermedad metabólica crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina, o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce **(OMS, 2016)**. Los factores que contribuyen a que se desarrolle la hiperglucemia son: la deficiencia en la secreción y/o acción de la insulina y disminución de la utilización de la glucosa. El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos **(Powers, 2012)**. Los síntomas de la hiperglucemia incluyen: polidipsia, polifagia, poliuria, pérdida de peso, visión borrosa, también puede observarse deterioro del crecimiento y susceptibilidad a ciertas infecciones **(Brownlee, 2005)**. El paciente con diabétes presenta 40 veces mayor riesgo de amputación de miembros inferiores, 25 veces mayor riesgo de insuficiencia renal terminal, 20 veces más riesgo de presentar ceguera, de 2 a 5 veces mayor riesgo de infarto agudo al miocardio y accidentes cerebrovasculares **(Mann, 2002)**. La DM también aumenta la susceptibilidad de desarrollar hipertensión, dislipidemia y obesidad **(Klein et al., 2002)**.

3.2.2 Clasificación y diagnóstico

El comité de expertos de la ADA (Asociación Americana de Diabetes) establece la siguiente clasificación etiológica de la DM:

Tabla 2. Clasificación de la diabetes mellitus. (Tomado y modificado de ADA., 2010).	
1. Diabetes mellitus tipo 1 (destrucción de la célula β con isulinopenia)	A. Mediada inmunológicamente
	B. Idiopática
2. Diabetes mellitus tipo 2 (resistencia insulínica $\pm$ déficit en la secreción de insulina)	
3. Otros específicos	A. Defectos genéticos en la función de la célula β
	B. Defectos genéticos en la acción de la insulina
	C. Enfermedades del páncreas exócrino
	D. Asociada a endocrinopatías
	E. Diabetes inducida por sustancias químicas
	F. Infecciones
	G. Formas poco comunes de diabetes mediadas por mecanismo inmunitario.
	H. Otros síndromes genéticos asociados a diabetes mellitus
4. Diabetes gestacional	

Las dos principales categorías de esta clasificación son:

Diabetes mellitus tipo 1

La DM tipo 1 suele desarrollarse repentinamente y es consecuencia de las interacciones de factores genéticos, ambientales e inmunológicos, que culminan en la destrucción autoinmune de las células β del páncreas y la deficiencia en la secreción de insulina. Dicha enfermedad es consecuencia de la destrucción auto inmunitaria de las células β del páncreas (**Powers, 2012**). Los pacientes que presentan esta enfermedad precisan la administración de insulina para normalizar sus niveles de glucemia (**Luque, 2011**).

Diabetes mellitus tipo 2

Este tipo de DM aparece en sujetos que presentan resistencia a la insulina y un déficit relativo de insulina, provocando una acumulación de glucosa en la sangre (hiperglucemia). Los diabéticos tipo 2 no precisan la administración de insulina para prevenir la aparición de cetosis, si bien pueden llegar a necesitarla en algún momento de su vida para controlar la hiperglucemia (Luque, 2011).

Diagnóstico de la DM

Los criterios diagnósticos para la DM empleados en la actualidad son los de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Federación Internacional de Diabetes (FID) y de la ADA (Luque, 2011) y se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Criterios de diagnóstico para la Diabetes mellitus. (Tomado y modificado de OMS-FID., 2006, ADA., 2010). SOG: Sobrecarga oral de glucosa. HbA1c: Hemoglobina glucosada.	
ADA 2010	OMS-FID (modificación provisional del año 2010)
1. Glucemia sérica al azar ≥ 200 mg/dL con clínica cardinal o crisis hiperglucémica.	1. Glucemia sérica ≥ 200 mg/dL con clínica cardinal o crisis hiperglucémica.
2. Glucemia sérica en ayunas ≥ 126 mg/dL.	2. Glucemia sérica en ayunas ≥ 126 mg/dL.
3. Glucemia sérica a las 2 h de SOG ≥ 200 mg/dL.	3. Glucemia sérica las 2 h de SOG ≥ 200 mg/dL.
4. HbA1c $\geq 6,5\%$.	4. HbA1c $\geq 6,5\%$ si: -Se garantizan estándares de calidad en su determinación y referencias internacionales. -No existe hemoglobinopatía o enfermedad de base que pueda alterar su determinación. (Ejemplo: Anemia falciforme, cirrosis, insuficiencia renal crónica avanzada).
En ausencia de descompensación metabólica estos criterios, salvo el 1, deben confirmarse repitiendo el análisis otro día, preferiblemente con la misma prueba diagnóstica.	El criterio 1 es suficiente para el diagnóstico de DM. La SOG se recomienda en la práctica habitual cuando el paciente presenta una glucemia alterada en ayunas. Los test con glucosa siguen siendo de elección frente a la HbA1c. Una HbA1c $<6,5\%$ no excluye el diagnóstico de DM.

3.2.3 Estadísticas actuales de la diabetes a nivel mundial y en México

La diabetes es una de las mayores emergencias mundiales de salud del siglo XXI ya que cada año más personas viven con esta condición. Además de los 415 millones de adultos que actualmente tienen diabetes, hay 318 millones de adultos con tolerancia a la glucosa alterada, lo que les sitúa en un alto riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro (FID, 2015).

La Diabetes tipo 2 es el tipo de diabetes más común y ha aumentado junto a los cambios culturales y sociales. En países desarrollados, hasta un 91% de adultos con la enfermedad tienen diabetes tipo 2. La FID estima que 193 millones de personas con diabetes no están diagnosticadas y tienen, por tanto, un mayor riesgo de desarrollar complicaciones. Aunque la diabetes tipo 1 es menos común, todavía sigue aumentando en torno al 3% cada año, particularmente entre los niños (FID, 2015).

La diabetes y sus complicaciones son las mayores causas de muerte en muchos países, se estima que 1 de cada 11 adultos de la población mundial tiene diabetes. Aproximadamente 5 millones de personas con edad comprendida entre los 20 y 79 años, murieron a causa de la diabetes durante el año 2015. Con un 12.9% (10.8- 14.5%) de la población adulta afectada, Norte América y la región del Caribe tienen la más alta prevalencia de diabetes en comparación con otros países, donde México ocupa el séptimo lugar (Tabla 4). Un estimado de 44.3 (37.1-49.9) millones de personas con diabetes de entre 20-79 años de edad viven en Norte América y el Caribe, de los cuales 13.3 millones (29.9%) no son diagnosticadas (FID, 2015).

Tabla 4. Principales países con mayor prevalencia de Diabetes tipo 1 en 2015. (Tomado y modificado de OMS-FID, 2006; ADA, 2010).		
Lugar	País	Personas con intolerancia a la glucosa
1	India	36.5 millones
2	Estados Unidos	35.8 millones
3	Indonesia	29.0 millones
4	China	26.7 millones
5	Japón	11.9 millones
6	Brasil	11.0 millones
7	México	10.7 millones
8	Pakistán	7.9 millones

La diabetes tipo 1 es uno de los trastornos metabólicos más comunes en la infancia. El número de niños que desarrollan esta forma de diabetes está aumentando cada año a nivel mundial; durante el año 2015, México ocupó el décimo lugar con mayor número de casos de diabetes tipo 1 en la infancia (Tabla 5) (FID, 2015).

Tabla 5. Países con mayor prevalencia de Diabetes tipo 1 en niños (Tomado y modificado de OMS-FID, 2006; ADA, 2010).		
Lugar	País	Número de niños con Diabetes tipo 1
1	Estados Unidos	84,100
2	India	70,200
3	Brasil	30,500
4	China	30,500
5	Reino Unido	19,800
6	Rusia	18,500
7	Arabia Saudita	16,200
8	Alemania	15,800
9	Nigeria	14,400
10	México	13,500

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-2012 (ENSANUT-2012) en México la proporción de adultos con diagnóstico médico previo de DM fue de 9.2%, lo que muestra un incremento de 2.2% con respecto a la ENSANUT-2006 (7%). Este hecho es muy importante en términos de la demanda por servicios de salud que actualmente ocurre en el sistema de salud y es indicativo de la gravedad del problema que representa la DM en México (ENSANUT, 2012).

Tabla 6. Principales causas de muerte en México (INEGI, 2016).

Principales causas	Defunciones
Total	291,637
Enfermedades del corazón	60,670
Diabetes mellitus	50,705
Tumores malignos	40,612
Enfermedades cerebrovasculares	17,595
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	9,964
Enfermedades del hígado	9,958
Accidentes	8,856
Influenza y neumonía	8,430
Insuficiencia renal	5,961
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	4,352
Las demás causas	46,465

3.3 Transportadores de glucosa (GLUT)

El transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células de mamífero representa uno de los eventos más importantes del transporte de nutrientes ya que este monosacárido tiene un papel central en el metabolismo y en la homeostasis celular. El ingreso de la glucosa a las células se realiza mediante dos tipos de proteínas acarreadoras: los transportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT) y los sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT). Los transportadores de glucosa (GLUT) son un grupo de proteínas encargadas del transporte de los monosacáridos al interior de todas las células del organismo. Se han identificado 13 GLUT (GLUT 1 - GLUT 13), divididas en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, como su especificidad al sustrato (glucosa, fructosa y/ o galactosa) (**Castrejón, 2007**).

3.3.1 Órganos insulino-dependientes y órganos no insulino-dependientes

Cada órgano del cuerpo tiene proteínas GLUT diferentes y se dividen en 2 grupos: insulino-dependientes; como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el tejido cardíaco que tienen el transportador GLUT4. Otros tejidos, no dependen de la insulina para transportar glucosa al interior; tales como el cerebro, el hígado, los eritrocitos, las células epiteliales del intestino y del riñón (**Drucker, 2005**).

Dado que algunos órganos como el hígado necesitan de la continua translocación de la glucosa al interior celular para su buen funcionamiento, no necesitan la presencia de la insulina, por lo que son dañados por la hiperglucemia, además, están altamente vascularizados, lo que propicia las complicaciones de la diabetes.

3.4 Anatomía del hígado

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo. Está situado debajo del diafragma, arriba del duodeno y delante del estómago. Dispone de una vascularización particular: La sangre le llega por dos vías: la de la arteria hepática y la de la vena porta. Esta sangre sale del hígado por las venas hepáticas (suprahepáticas), voluminosos afluentes de la vena cava inferior. Las modificaciones que experimenta la sangre en el hígado lo convierten además en una verdadera “glándula de secreción interna” con múltiples funciones (Laterjet, 1999).

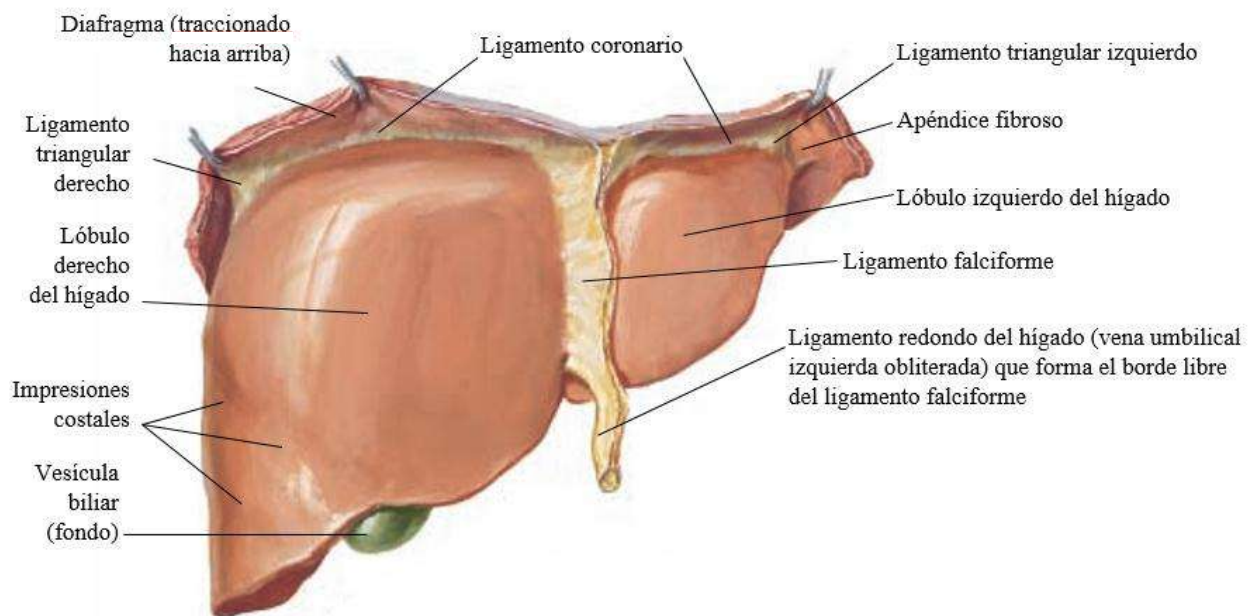


Figura 1. Cara anterosuperior o diafragmática del hígado (Laterjet, 1999).

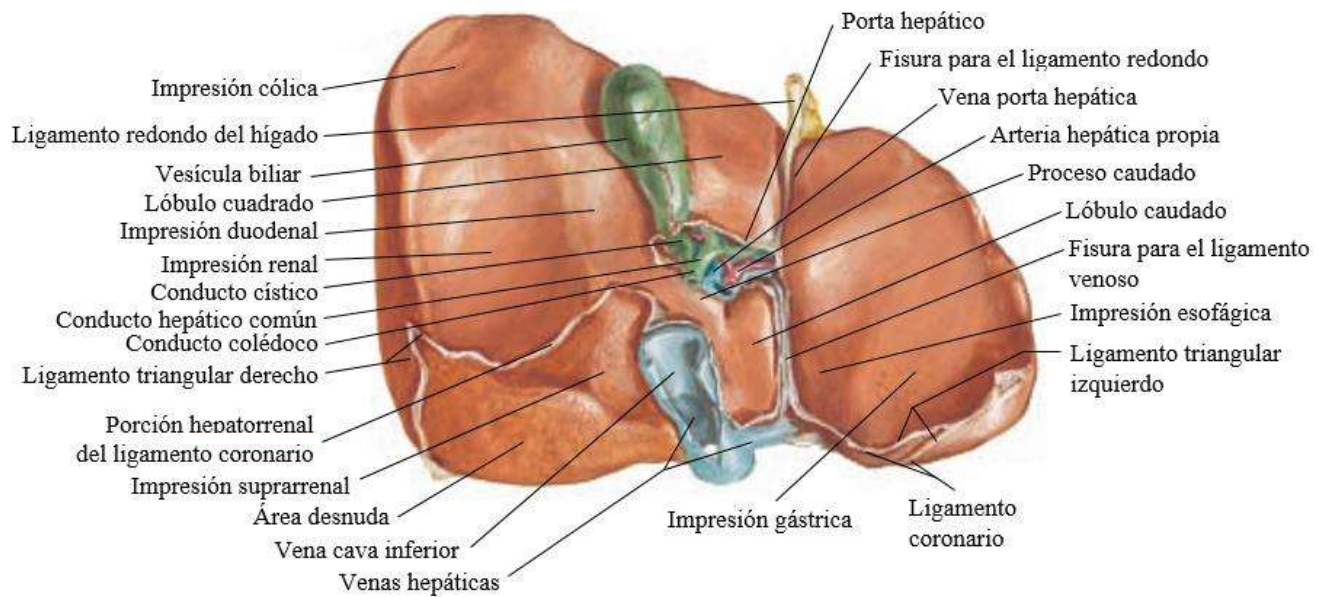


Figura 2. Cara posteroinferior o visceral del hígado (Latarjet, 1999).

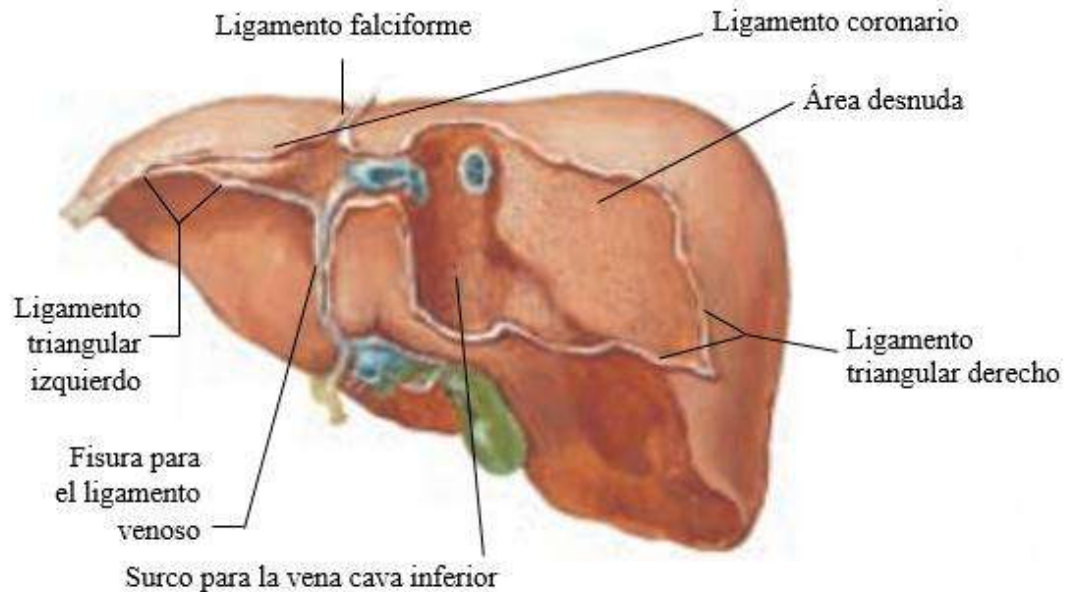


Figura 3. Cara posterior del hígado (Latarjet, 1999).

3.4.1 Funciones del hígado

3.4.2 Metabolismo de carbohidratos

El hígado conserva los valores normales de glucemia mediante el transporte a los hepatocitos y su almacenamiento en forma de glucógeno. Cuando las concentraciones sanguíneas de glucosa disminuyen de la concentración normal, los hepatocitos hidrolizan glucógeno (glucogenólisis) en glucosa y la transportan fuera de las células al espacio de Disse (espacio estrecho entre una placa de hepatocitos y las células del recubrimiento sinusoidal). Los hepatocitos también pueden sintetizar glucosa a partir de otros monosacáridos (como fructosa y galactosa) o de fuentes que no son carbohidratos, un proceso que se conoce como gluconeogénesis (**Gartner, 2002**).

3.4.2.1 Gluconeogénesis

Cuando el organismo ha disminuido la reserva de glucógeno y no hay ingesta de carbohidratos, se ve obligado a sintetizar glucosa a partir de otros compuestos, como el glicerol proveniente de la rotura de grasas neutras o triglicéridos de los depósitos, o de aminoácidos. Este proceso se denomina gluconeogénesis e involucra el abastecimiento de metabolitos al ciclo de Krebs y la reserva de la glucólisis.

3.4.3 Excreción de bilirrubina

La bilirrubina, un pigmento verde amarillento insoluble en agua, es el producto de la degradación tóxica de la hemoglobina. Conforme los eritrocitos muertos son destruidos por los macrófagos en el bazo y por las células de Kupffer en el hígado, se libera bilirrubina al torrente sanguíneo y se une a la albúmina del plasma. En esta forma se conoce como bilirrubina libre, es endocitada por los hepatocitos. La enzima transferasa de glucuronilo, que se localiza en el retículo endoplásmico liso (REL) del hepatocito, cataliza la conjugación de bilirrubina con glucorónido de bilirrubina (bilirrubina conjugada) hidrosoluble. Una parte del glucurónido de bilirrubina se libera al torrente sanguíneo, pero

la mayor parte se excreta a los canaliculos biliares a fin de llevarse al tubo digestivo para su eliminación subsecuente con las heces (**Gartner, 2002**).

3.4.4 Regeneración hepática

Los hepatocitos son células de vida cercana a 150 días; sin embargo, cuando se administran medicamentos hepatotóxicos o se extirpa una porción del hígado, los hepatocitos proliferan y el hígado regenera su arquitectura y tamaño previo normales. La capacidad de regeneración del hígado de roedores es tan grande que si se extirpa un 75% del órgano, éste se regenera hasta su tamaño normal en el transcurso de 4 semanas. La capacidad regenerativa del hígado del hombre es mucho menor que la de los ratones y las ratas. Los factores que controlan el mecanismo de regeneración del hígado son: el factor de transformación del crecimiento alfa, el factor de transformación del crecimiento beta, el factor de crecimiento epidérmico, la interleucina 6 y el factor de crecimiento del hepatocito. Muchos de esos factores son liberados por las células estrelladas que almacenan grasa (células Ito) localizadas en el espacio de Disse, aunque también se encuentra factor de crecimiento del hepatocito, unido a heparina, en la matriz extracelular escasa del hígado. En la mayor parte de los casos la regeneración se debe a la capacidad de replicación de los hepatocitos restantes (**Gartner, 2002**).

3.5 Hígado y diabetes

En pacientes con diabetes, la prevalencia de esteatosis hepática no alcohólica o hígado graso (NAFLD) está en un 50-75 %. La DM 2 también incrementa el riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en 2.6 veces. Y al revés, la prevalencia de la diabetes en pacientes con NAFLD, oscila según las series entre 30-80 %. Es probable que cuando se elevan las enzimas hepáticas en la NAFLD, este hecho tenga relación con el desarrollo de la DM 2, puesto que la grasa ectópica en las células del hígado puede conducir a la resistencia a la insulina hepática (**Sattar et al., 2007**). La NAFLD, es un trastorno común que se caracteriza por acumulación de grasa dentro del hepatocito en sujetos que no consumen excesiva cantidad de alcohol. Por definición, al menos el 5 % del

peso del hígado, se debe a la acumulación de grasa. La NASH se describió por primera vez en 1981, como una enfermedad anecdótica y ha pasado a ser la causa más común de enfermedad hepática crónica incidente al final de la década actual. Este incremento tan espectacular, se relaciona directamente con el aumento de las enfermedades metabólicas en las últimas décadas; la NASH se caracteriza por inflamación y daño en el hepatocito y ésta situación puede desembocar en fibrosis y cirrosis (**Randall, 1989**). La causa inicial es la acumulación de grasa dentro del hepatocito. La grasa en el hígado puede proceder de tres fuentes: Ingesta, síntesis de novo y los ácidos grasos no esterificados procedentes de los depósitos grasos (NEFA). Los NEFA son la principal fuente de acúmulo de grasa en el hígado. Se ha estudiado la procedencia de esa grasa ectópica en el hígado y se ha estimado que el 60 % proviene de los NEFA, el 34 % de incremento de la lipogénesis de novo y solo un 14 % de la grasa de la dieta (**Donnelly et al., 2005**). La resistencia a la insulina desempeña un papel fundamental en este incremento de la llegada de NEFA al hígado. Se ha demostrado que la NAFLD está relacionada con la resistencia a la insulina en los adipocitos y el hígado; además, los sujetos con NAFLD tienen alterada la capacidad de la insulina de suprimir la producción hepática de glucosa y la lipólisis.

Existe una teoría que centra la causa del acúmulo de grasa ectópica en la insuficiencia del tejido adiposo para seguir almacenando grasa. El tejido adiposo pierde la capacidad de hiperplasiarse a partir de células multipotentes del estroma y, por tanto, para responder al exceso de grasa de la ingesta no queda otro mecanismo que hipertrofiarse, pero este mecanismo se vuelve pronto insuficiente. Esta incapacidad hace que se acumule en otros tejidos y este acúmulo en tejidos no grasos se acompañaría de resistencia a la insulina en ellos. Tanto la obesidad extrema como la lipodistrofia son dos caras de la misma moneda: Algunos sujetos obesos agotan su capacidad de almacenar grasa en su tejido adiposo y pasan a almacenarla en tejidos ectópicos y en la lipodistrofia hay una atrofia del tejido adiposo que lo imposibilita y que obliga a depositar la grasa también en tejidos no grasos (fundamentalmente en el hígado) (**Cai et al., 2005**).

Inflamación y acúmulo de grasa en el hígado

Un factor que podría estar involucrado en el proceso, es la adiponectina, molécula que incrementa la sensibilidad a la insulina. Se ha descrito un descenso de adiponectina en

pacientes con NAFLD y NASH, ajustados por índice de masa corporal (IMC) con respecto a controles sin patología hepática (**Polyzos et al., 2010**). La insulina puede dañar el hígado directa o indirectamente. La acción directa es por la capacidad de la insulina de generar estrés oxidativo y conducir a la muerte celular o apoptosis, y la acción indirecta estaría relacionada con que la resistencia a la insulina contribuye a incrementar la acumulación de grasa en el hígado (**Younossi et al., 2004**). El incremento de los NEFA es capaz de generar estrés oxidativo y peroxidación lipídica. Además, los NEFA en el hepatocito estimulan la catepsina B, que activa la ruta de NF- κ B incrementando la secreción de TNF α , y, por otro lado, la catepsina B activa la vía de las caspasas poniendo en marcha mecanismos apoptóticos (**McCullough, 2006**). La inflamación e incremento del estrés oxidativo se han postulado como los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina. La fisiopatología fundamental relacionada con la NASH es la resistencia insulínica y la acumulación de grasa en el hepatocito (**Shyangdan et al., 2011**).

3.6 Pruebas de función hepática

El hígado lleva a cabo varias funciones bioquímicas de síntesis y de excreción, por lo cual no hay una prueba que tenga la capacidad de definir el estado de la función total del hígado. Para esto, se utilizan un conjunto de pruebas denominadas: Pruebas de función hepática, y se utilizan para:

- 1) Determinar presencia o ausencia de daño hepático.
- 2) Realizar diagnósticos específicos.
- 3) Determinar severidad y establecer pronósticos.
- 4) Monitorizar el curso de la enfermedad hepática.

The National Academy of Clinical Biochemistry y la *American Association for the Study of Liver Diseases*, recomiendan un panel específico de exámenes para ser usado en la evaluación inicial de un paciente con una enfermedad hepática conocida o sospechada, designado como “Perfil de función hepática”, que está compuesto por los siguientes analitos: proteínas totales, albúmina, aspartato aminotransferasa (AST o TGO), alanino

aminotransferasa (ALT o TGP), fosfatasa alcalina, bilirrubina total, bilirrubina directa e indirecta (**Fernández et al., 2008**).

3.6.1 Pruebas indicadoras de necrosis

3.6.1.1 Transaminasas Alanino amino transferasa (ALT) y Aspartato amino transferasa (AST)

Son las más comúnmente utilizadas para evaluar la presencia de necrosis hepática. Se encuentran en altas concentraciones en las células hepáticas, donde catalizan la transferencia de grupos amino para producir ácido pirúvico y oxaloacético, respectivamente, utilizando vitamina B6 como cofactor (**Dufour et al., 2000**). Cuando se presenta daño en la membrana del hepatocito, estas enzimas que se encuentran en el citoplasma de las células pasan al plasma, aumentando su concentración en circulación. Las transaminasas son sensibles, pero poco específicas del daño de los hepatocitos, siendo la ALT más específica que la AST, ya que ésta no sólo se encuentra en el hígado sino también en el músculo esquelético, cardíaco, riñón y eritrocito (**Kew, 2000**).

AST



ALT



3.6.1.2 Lactato deshidrogenasa (LDH)

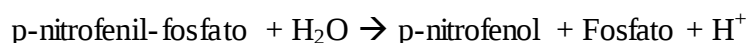
La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos y cataliza la oxidación reversible de ácido láctico a ácido pirúvico. Existen cinco isoenzimas, LD1 a LD5, distribuidas en hígado y otros tejidos como el músculo cardíaco, riñón y eritrocitos, lo cual le resta especificidad a esta prueba como indicadora de daño hepático (**Pincus et al., 2007**).



3.6.2 Pruebas indicadoras de colestasis

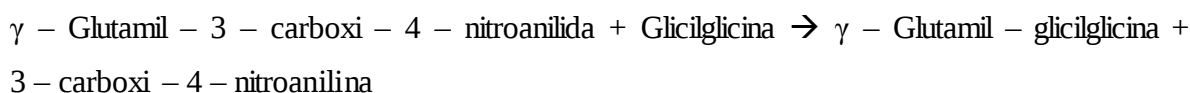
3.6.2.1 Fosfatasa alcalina (FA)

La fosfatasa alcalina (FA) se encuentra en varios tejidos, incluyendo el hígado, el hueso, el riñón y la placenta (**Dufour et al., 2000**). Cada uno de estos sitios contiene una isoenzima diferente que puede ser separada mediante electroforesis. La fosfatasa alcalina del hígado se encuentra en la superficie canalicular y por tanto es un marcador de disfunción biliar, cuyos valores se pueden aumentar hasta 10 veces en obstrucciones de las vías biliares, en procesos infecciosos o en presencia de masas (**Tolaymat et al., 2000**). En el individuo normal, la mayoría de la fosfatasa alcalina está compuesta por la fosfatasa alcalina proveniente de hígado y del hueso (**Fernández et al., 2008**).



3.6.2.2 Gamma-glutamyl transferasa

La gamma-glutamyl transferasa (GGT) regula el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, al catalizar la transferencia de un grupo glutamil a los aminoácidos libres. Su medición concomitante con la fosfatasa alcalina, es fundamental en la determinación del origen de unos valores altos de fosfatasa alcalina, ya que la gamma-glutamyl transferasa se asocia con una enfermedad de tracto biliar (**Gopal et al., 2000**).



3.6.3 Pruebas metabólicas

3.6.3.1 Bilirrubina

La bilirrubina es el principal metabolito del grupo hemo de la hemoglobina, mioglobina y los citocromos. Diariamente se producen alrededor de 250-350 mg de bilirrubina, 85% como resultado de la destrucción de los eritrocitos viejos. La mayoría de la bilirrubina es transportada unida a la albúmina (directa o conjugada). El aumento de la

bilirrubina total, junto con el aumento de la bilirrubina directa, se presenta cuando hay necrosis y colestasis, en tanto, que concomitante con el aumento de la bilirrubina indirecta, se asocia con hemólisis de Gilbert (**Gopal et al., 2000**).

3.7 Metabolismo de lípidos

Durante la digestión, la mayoría de los triglicéridos se escinden en monoglicéridos y ácidos grasos. Después, mientras atraviesan las células epiteliales intestinales, vuelven a formar nuevas moléculas de triglicéridos, que entran en la linfa en forma de diminutas gotas dispersas llamadas quilomicrones (**Guyton, 2011**). Los quilomicrones llegan al hígado a través de ramas de la arteria hepática. Dentro de los hepatocitos se degradan en ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos se desaturan y se utilizan para sintetizar fosfolípidos y colesterol o se degradan en acetil coenzima A. Dos moléculas de esta última se combinan para formar ácido acetoacético. Gran parte de éste se convierte en ácido hidroxibutírico β (beta) y parte en acetona. Estos tres compuestos se conocen como cuerpos cetónicos. Los fosfolípidos, el colesterol y los cuerpos cetónicos se almacenan en hepatocitos hasta que se liberan al espacio de Disse. Además, el hígado produce lipoproteínas de muy baja densidad, que también se liberan al espacio de Disse como gotitas de 30 a 100 nm de diámetro (**Gartner, 2002**).

3.7.1 Hidrólisis de los triglicéridos

El primer estadio en el uso energético de los triglicéridos es la hidrólisis de los mismos en ácidos grasos y glicerol. Después, los ácidos grasos y el glicerol son transportados por la sangre a los tejidos activos, donde se oxidan para dar energía. Casi todas las células, con algunas excepciones, como el tejido cerebral y los eritrocitos, pueden utilizar los ácidos grasos con fines energéticos (**Guyton, 2011**). El glicerol, al entrar en el tejido activo, se transforma de inmediato, por la acción de las enzimas intracelulares, en glicerol 3-fosfato, que sigue la vía glucolítica de degradación de la glucosa para proveer energía.

3.8 Lípidos hepáticos

El hígado almacena grandes cantidades de triglicéridos: 1) durante las primeras fases del ayuno; 2) durante la diabetes y 3) en cualquier otro estado donde se use rápidamente la grasa en lugar de los carbohidratos para obtener energía. En estas condiciones se movilizan grandes cantidades de triglicéridos desde el tejido adiposo, se transportan en forma de ácidos grasos libres por la sangre y se depositan de nuevo como triglicéridos en el hígado, donde comienza gran parte de la descomposición inicial de la grasa. De este modo, en condiciones fisiológicas normales, la cantidad total de triglicéridos del hígado está determinada en gran medida por la tasa global de su utilización energética. El hígado puede almacenar también grandes cantidades de lípidos en caso de lipodistrofia, un trastorno caracterizado por atrofia o deficiencia genética de adipocitos. La célula hepática, además de triglicéridos, contiene grandes cantidades de fosfolípidos y de colesterol, que el hígado sintetiza continuamente. Además, los hepatocitos son más capaces de desaturar los ácidos grasos que las células de otros tejidos, de manera que los triglicéridos hepáticos se encuentran normalmente mucho más insaturados que los del tejido adiposo. Esta capacidad del hígado para desaturar los ácidos grasos reviste una importancia funcional para todos los tejidos del cuerpo, ya que muchos componentes estructurales de todas las células contienen cantidades razonables de grasas insaturadas y su fuente principal es el hígado (Guyton, 2011).

3.9 Perfil de Lípidos

3.9.1 Colesterol

El colesterol es un lípido sencillo, que se presenta en el organismo en forma libre y esterificada (60-70% del colesterol total). Debe distinguirse entre el colesterol exógeno que es ingerido con el alimento y el colesterol endógeno que es sintetizado en el hígado y en otros órganos. La fracción introducida con los alimentos supone del 20-30% de la cantidad de colesterol endógeno. El colesterol plasmático proviene en parte de su síntesis endógena y, por otro lado, del procedente de la ingesta. Por su naturaleza isoprenoide, en la biosíntesis del colesterol se utiliza como materia prima el acetyl-CoA.

Teóricamente todas las células del organismo pueden sintetizar colesterol; sin embargo, más del 90% de este esteroide es sintetizado en el hígado y el tracto intestinal. Aunque el colesterol se encuentra presente en todas las células del organismo, su descomposición y excreción sólo se realiza por vía hepática. El colesterol forma parte de las membranas celulares y es un importante precursor de los ácidos y sales biliares, así como de las hormonas esteroideas (Díaz *et al.*, 1997).

En el laboratorio de análisis clínicos han establecido los siguientes intervalos de normalidad en humanos:

- Colesterol total o límite superior por debajo de 200 mg/dL (para menores de 18 años el límite superior óptimo deberá ser de 180 mg/dL).
- Hipercolesterolemia límite: 200 – 250 mg/dL.
- Hipercolesterolemia definida cuando los valores de colesterol superan los 250 mg/dL (Orgaz, 2007).

3.9.2 Triglicéridos

Los triglicéridos son ésteres derivados del glicerol y de diversos ácidos grasos (principalmente oleico, palmítico y linoleico). Constituyen la principal fuente de energía, siendo asimismo el componente principal del adipocito. Se puede distinguir entre triglicéridos exógenos (ingeridos con el alimento) y endógenos. Los primeros se incorporan desde el intestino, donde son resintetizados a partir de las grasas absorbidas de la dieta. Los triglicéridos endógenos se forman principalmente en el hígado a partir del acetil-CoA. Los fosfolípidos son lípidos complejos formados por ácidos grasos, glicerol y ácido fosfórico. Presentan una función estructural formando parte de las membranas celulares y por su naturaleza polar o antipática realizan funciones de mantener en suspensión a otras moléculas (Díaz *et al.*, 1997).

3.9.3 Lipoproteínas

Todas las lipoproteínas presentan unas características comunes: son partículas esféricas con una zona central no polar donde se sitúan los lípidos hidrófobos (colesterol esterificado y triglicéridos) y una zona periférica formada por elementos hidrosolubles, fosfolípidos, colesterol libre (lípidos antipáticos) y diversas proteínas específicas con un patrón de distribución característico en las diferentes clases de lipoproteínas. Dentro del amplio espectro de partículas lipoprotéicas del plasma, se distinguen cinco grandes clases, con marcadas diferencias fisicoquímicas y funcionales: Quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (**Díaz et al., 1997**).

3.9.3.1 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son las partículas lipoprotéicas de menor tamaño, con una mayor relación proteínas/lípidos, lo que justifica su elevada densidad. Desempeñan un papel fundamental en el metabolismo del colesterol, en particular en el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para su posterior excreción por la bilis, en forma de sales biliares (**Díaz et al., 1997**).

3.9.3.2 Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

En su mayor parte, proceden del catabolismo de las VLDL, aunque son sintetizadas también directamente a nivel hepático. Sólo contienen ésteres de colesterol en su núcleo y una única variedad de apoproteína, llamada apo B₁₀₀, en su revestimiento externo. Casi tres cuartas partes del colesterol que circula en la sangre de un individuo sano se encuentra en esas LDL. Es decir, las LDL aseguran la mayor parte del transporte sanguíneo del colesterol a los tejidos periféricos. La concentración de LDL plasmática está determinada por la tasa con la que la VLDL se convierte en LDL, es decir por la tasa de producción de LDL y por la velocidad con que esta fracción lipoproteína es eliminada del plasma. La sobreproducción de partículas de VLDL se asocia a un aumento de la conversión de la VLDL en LDL y, por consiguiente, el aumento de la producción de LDL puede “saturar” su

eliminación vía receptor. En estas circunstancias, las LDL son captadas por los macrófagos, convirtiéndose en células espumosas una vez que penetran en la pared arterial. Esta posibilidad de captación tisular es esencial para darse cuenta del poder aterógeno latente de las LDL que pueden, en ciertas circunstancias, ceder un exceso de lípidos a la pared vascular (Díaz *et al.*, 1997).

3.9.3.3 Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Son también lipoproteínas ricas en triglicéridos, pero en este caso contienen numerosos glicéridos de origen endógeno. Así, alrededor del 90% de los triglicéridos presentes en el plasma sanguíneo en ayunas son sintetizados en el hígado y secretados como componentes de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Una vez segregadas y en circulación, las VLDL interaccionan en primer lugar con las HDL, que le ceden la apo C-II, necesaria para su posterior interacción con la lipoproteinlipasa (LPL). La acción de la LPL trae como consecuencia la liberación de ácidos grasos libres (NEFA), que son captados por las células musculares y los adipocitos y la formación de partículas residuales de las VLDL, llamadas IDL. Estas partículas son ricas en ésteres de colesterol y prácticamente la única apoproteína que contienen es la apo B₁₀₀. Estas lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) presentan un doble destino: Una pequeña parte será catabolizada en el hígado, por interacción con los receptores hepáticos para la apo B₁₀₀, y el resto originará la mayor parte de las LDL (Díaz *et al.*, 1997).

3.10 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en prácticamente todas las células eucariotas. Están encargados de suministrar la mayor parte de la energía química necesaria para la actividad celular, al sintetizar ATP a expensas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, por medio de la fosforilación oxidativa (Alberts *et al.*, 2002). En promedio hay unas 2,000 mitocondrias por célula, pero las que desarrollan mayor actividad metabólica, como las musculares, tienen un número mayor en comparación con las poco activas, por ejemplo las células epiteliales (Lehninger *et al.*, 2002).

La mitocondria se compone de dos membranas, la externa, que la separa del citoplasma y la interna, que define el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (Figura 4). La membrana externa permite el paso de moléculas pequeñas (hasta 10 kDa) mientras que la membrana interna constituye una barrera más selectiva, siendo esta restricción de paso indispensable para el mantenimiento del gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP. La membrana interna presenta una serie de pliegues denominados crestas que le proporcionan una gran superficie (Audesirk, 2008).

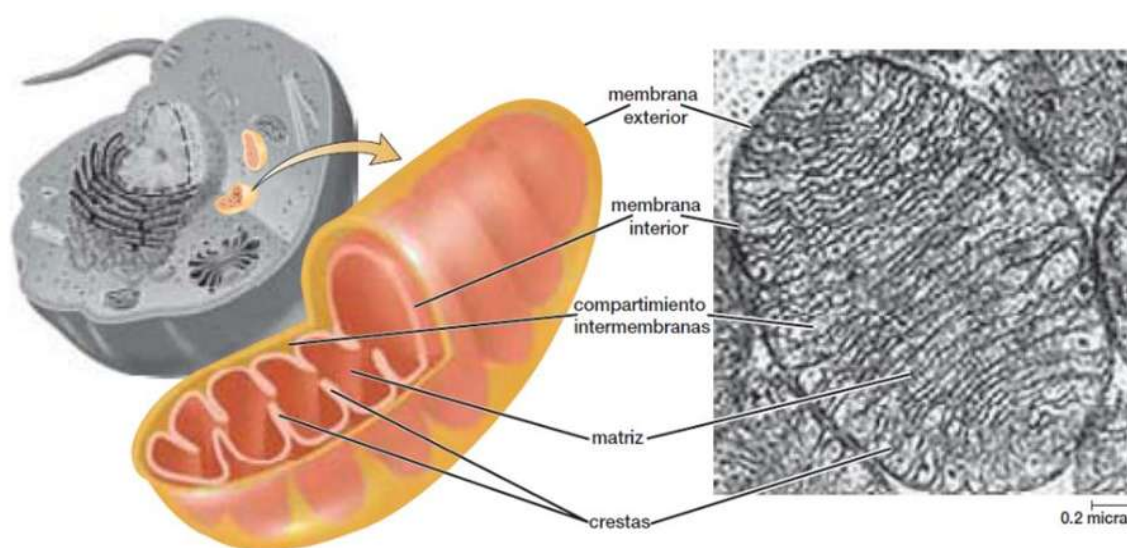


Figura 4. Estructura interna de la mitocondria (Audesirk, 2008).

3.10.1 Hiperglucemia y el mal funcionamiento de la mitocondria

Las mitocondrias fallan durante la diabetes debido principalmente a los altos niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia). El exceso de glucosa sobrecarga a las mitocondrias con una vasta cantidad de sustratos, sobrepasando su capacidad para metabolizar la glucosa y a otros sustratos tales como los lípidos (grasas) y los aminoácidos. El proceso de combustión de estas moléculas en las mitocondrias, consiste en el rompimiento de los enlaces químicos que unen a sus átomos. A su vez, el rompimiento de los enlaces químicos libera energía y la mitocondria acumula esa energía en el ATP. En la diabetes, los electrones son manejados de manera defectuosa por la mitocondria, lo que da

lugar a su reacción descontrolada con el oxígeno para generar RL, además de que éstos son generados continuamente durante el metabolismo, pero durante la diabetes, se forman de manera excesiva, sobrepasando los mecanismos de defensa antioxidante de las células. Además de que esto ocasiona daño en los lípidos, el material genético y las proteínas de las células, los RL sirven como “señales” químicas que activan mecanismos que hace que órganos como el riñón o el hígado produzcan proteínas que los vuelven “fibrosos” y rígidos. Así, el riñón, el hígado y otros tejidos pierden su función y se producen las complicaciones de la diabetes.

3.10.2 Cadena transportadora de electrones (CTE)

La cadena de transporte de electrones (CTE) es un conjunto multienzimático que está compuesta por proteínas que se encuentran ubicadas en la membrana interna mitocondrial. La CTE está formada por los complejos I, II, III, IV y la enzima ATPasa, que en conjunto son llamados “sistema de fosforilación oxidativa”. Los electrones procedentes del $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ pasan secuencialmente a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III y el citocromo c para llegar finalmente al complejo IV, que los cederá al oxígeno molecular para generar agua (H_2O). De forma alternativa, los electrones del FADH_2 , producto final de la succinato deshidrogenasa o complejo II, pasan a la ubiquinona y son canalizados mediante el complejo III, citocromo c y complejo IV para que lleguen finalmente hasta la reducción del oxígeno molecular. Este transporte de electrones no es del todo eficiente y a veces el oxígeno es reducido antes de llegar al complejo IV dando lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Murphy, 2009; Murphy *et al.*, 2011).

En los complejos I, III y IV de la CTE, se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal que genera un gradiente electroquímico (de pH y electrogénico) o potencial de membrana que es aprovechado por la ATPasa para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , completándose de este modo el proceso de fosforilación oxidativa (Mitchell, 1961; Mitchell y Moyle, 1967). El ATP generado en este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades

energéticas celulares. Así, aquellos tejidos que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su generación.

3.11 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Aunque generalmente las reacciones de oxidación aseguran que el oxígeno molecular sea reducido completamente a agua, los productos de la reducción parcial del oxígeno son altamente reactivos. Estos productos son conocidos como ERO. Algunos compuestos generados a través del oxígeno son considerados radicales libres, sin embargo producen estrés oxidativo:

- Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)
- Radical hidroperoxil ($HOO\bullet$)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Radical hidroxilo ($OH\bullet$)
- Radical lípido peróxido ($ROO\bullet$)
- Singulete de oxígeno (1O_2)

3.11.1 Características de las especies reactivas de oxígeno

- Extrema reactividad.
- Tiempo de vida corto.
- Generación de nuevas ERO por una reacción en cadena.
- Daño a diferentes tejidos (**Vasudevan et al., 2011**).

3.11.2 Generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Los RL se generan a nivel intracelular y extracelular y provienen de fuentes enzimáticas y no enzimáticas (**Rodríguez *et al.*, 2001; López, 2001; Venereo, 2002; Guzmán *et al.*, 2006; Ceballos *et al.*, 2006**):

Enzimáticas:

-Transferencia de electrones en la mitocondria, lo cual constituye la fuente orgánica principal de RL.

-Enzimas oxidantes como la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofanodioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa-oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la monoaminoxidasa y la NADPH oxidasa.

-Sistemas transportadores de electrones en el retículo endoplásmico y las membranas nucleares. - Peroxisomas, orgánulos del citosol muy ricos en oxidasas y que constituyen una importante fuente de H_2O_2 .

No enzimáticas:

-Autoxidación de flavinas reducidas, tioles y pequeñas moléculas como hidroxiquinonas, catecolaminas y tetrahidropterinas.

De manera anormal, la formación de RL puede verse incrementada en numerosas situaciones patológicas ante la acción de estimulantes de ésta (por ejemplo, bacterias opsonizadas, virus, inmunoglobulinas, péptidos quimiotácticos) y ante la exposición a varios agentes deletéreos (por ejemplo, radiaciones ionizantes, ozono, bióxido de nitrógeno, dióxido sulfúrico, estreptozotocina, doxorubicina, adriamicina, smog, lluvia ácida, pesticidas, varios compuestos radiactivos y humo de cigarrillo (**Rodríguez *et al.*, 2001; Venereo, 2002; Hicks *et al.*, 2006**).

El incremento en la producción de especies reactivas o prooxidantes se debe a la exposición a elevados niveles de O_2 u otras toxinas, que en sí mismas, son especies

reactivas o son metabolizadas vía generación de especies reactivas, o bien debido a la activación excesiva de los mecanismos naturales que generan especies reactivas.

Las ERO también se producen durante la β -oxidación de los ácidos grasos, por exposición a radiación, luz y drogas.

Algunas de las reacciones a través de las cuales son generadas las ERO son:

-Reacción de Fenton: $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$

-Reacción de Haber-Weiss: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + 2\text{OH}^\cdot$

-Reacción de dismutación por la superóxido dismutasa (SOD): $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

-Reacción de dismutación por catalasa: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^-$

La exposición a ERO provoca agregación y fragmentación de proteínas como consecuencia de la combinación errónea entre los péptidos y sus respectivos enlaces, o como resultado de los daños producidos durante la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN (Halliwell, 2007). Además, afecta a la síntesis de aminoácidos (Stadman y Levine, 2003) y produce modificaciones perjudiciales a nivel del ADN como roturas en las hebras de doble hélice y modificaciones en las bases nitrogenadas (Halliwell, 2007).

3.12 Relación de la diabetes con el estrés oxidativo

En esta enfermedad, la glucosa elevada altera la función de las proteínas, que junto con la autooxidación de los azúcares se generan ERO; por la disminución de la hemoxigenasa-1 que afecta a las células β del páncreas, promoviendo así el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad. Por otra parte, la vía del sorbitol (poliol) es otro mecanismo que alterará la función y estructura de las células, a través de la disminución de NADPH y GSH, favoreciendo el establecimiento del EO. En este sentido, varios estudios

clínicos han demostrado que la diabetes se asocia fuertemente con el EO (**Sánchez-Valle, 2013**).

La hiperglucemia puede estimular la generación de ERO a través de diferentes fuentes tales como la fosforilación oxidativa y glucólisis, aunque es en la mitocondria donde se ubica la principal fuente generadora de ERO, la cadena transportadora de electrones (CTE). La diabetes también afecta a la célula en los sistemas de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los niveles de hiperglucemia producen aniones superóxido y radicales hidroxilo en presencia de metales de transición causando daño a los lípidos de las membranas celulares, sin embargo, el grado del daño es tejido específico, siendo más susceptible el tejido cardíaco que el hepático o el renal, tal efecto es contrarrestado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Se ha postulado que la hiperglucemia puede causar complicaciones micro y macrovasculares mediante 5 mecanismos principales (**Brownlee, 2001; Thornalley, 2001**): acumulación y acción de productos de glicación avanzada (**Urich y Cerami, 2001; Thornalley, 2002; Méndez, 2003**); incremento en la actividad de la vía del sorbitol (**Gabbay, 1975**); aumento en la vía de las hexosaminas (**Marshall et al., 1991**); activación de diversas isoformas de la proteína cinasa C (**Koya y King, 1998**); y aumento en el EO (**Baynes y Thorpe, 1999; Maritim y Sanders, 2003**). El mecanismo que contribuye a las complicaciones de la diabetes es la modificación oxidativa de macromoléculas (**Mohamed et al., 1999**).

3.13 Antioxidantes y tipos de antioxidantes

Un antioxidante es toda sustancia que retrasa o previene el deterioro o daño provocados por una oxidación (**Youngson, 2003**). Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos, son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los RL, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas (**Benito-Peinado et al., 2014**).

3.13.1 Antioxidantes endógenos

En el organismo existen antioxidantes endógenos que evitan las reacciones en cadena que generan los RL (Fernandez y Montoya, 2003).

3.13.2 Moléculas antioxidantes endógenas

3.13.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD son una familia de enzimas que catalizan la dismutación de $O_2^{\cdot -}$. En los mamíferos se reconocen tres enzimas de esta familia, dos intracelulares y una extracelular. La SOD1 se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas y la membrana externa mitocondrial, su centro catalítico está formado por un cobre y un zinc (SOD Cu-Zn). Su expresión es inducida por estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, radiaciones ultravioleta, metales pesados y estrés oxidativo. La SOD2 se encuentra dentro de la mitocondria, ya que es un orgánulo que está sometido mayormente a estrés oxidativo y tiene un centro catalítico de Mn. La SOD3 está presente en la matriz extracelular principalmente unida a heparina y a las fibras de colágena tipo 1 de la mayoría de los tejidos, además se ha encontrado en plasma, fluido linfático y líquido cefalorraquídeo, pero su concentración es 20 veces mayor en la matriz extracelular que en el plasma (Gómez-Quiroz y Cuevas, 2008).

La reacción enzimática de la SOD se lleva a cabo en dos pasos, primero el $O_2^{\cdot -}$ llega al centro de reacción y se une a una arginina, el $O_2^{\cdot -}$ dona su electrón, el cual es transferido al Cu, que se transforma en Cu^+ , esto provoca que el enlace entre la histidina y el Cu se rompa y protone al nitrógeno de la histidina, el O_2 formado se disocia de la arginina y se libera. La segunda parte de la reacción comienza de manera similar a la primera, el $O_2^{\cdot -}$ llega al centro catalítico de la enzima y se une a una arginina; cerca del centro catalítico, se protone una molécula de agua (H_3O^+). El electrón que recibió el Cu es transferido al $O_2^{\cdot -}$ lo cual oxida al metal a su forma Cu_2^+ . Los dos electrones que posee el superóxido, forman inmediatamente dos enlaces covalentes con dos protones donados uno por la molécula de

agua y otro del nitrógeno de la histidina, con lo cual se libera H_2O_2 y la enzima se regenera **(Gómez Quiroz y Cuevas, 2008)**.

3.13.2.2 Catalasa (CAT)

La catalasa (CAT) realiza el metabolismo citosólico del H_2O_2 se localiza en los peroxisomas. La CAT contiene moléculas de NADPH y se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad al sustrato. Tiene dos funciones, una catalítica y una peroxidativa. En la reacción catalítica utiliza como donadores a otras moléculas de H_2O_2 **(Miranda, 2008)**. En la reacción peroxidativa la enzima utiliza como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído. Una molécula de catalasa es capaz de catalizar la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo, la primera reacción tanto del mecanismo catalítico como peroxidativo es la heterólisis o rompimiento de los enlaces oxígeno-oxígeno, en la reacción catalítica se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno y forma agua **(Peraza-Reyes, 2008)**.

3.13.2.3 Glutación (GSH)

El glutación (GSH) es una molécula única que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, teniendo un papel central en la defensa contra el daño oxidativo. El GSH (L-g-glutamyl-L-cisteinil-glicina) es un tripeptido con enlace isopeptídico y un grupo sulfhidrilo libre (-SH) que, a altas concentraciones se presenta en todas las células y realiza importantes funciones en la eliminación de peróxidos y la reducción de ferrihemoglobina (Fe^+) y de ácido deshidroascórbico **(Werner Müller-Esterl, 2008)**. La síntesis de GSH (figura 2) se produce en el citosol de todas las células a partir de sus aminoácidos precursores: Glicina, cisteína y ácido glutámico. La insulina estimula la síntesis de GSH, ya que induce selectivamente la transcripción de la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (GCL), una enzima que conjuntamente con la glutación sintetasa (GS) catalizan la síntesis de GSH. Esta situación es de gran relevancia en los pacientes con diabetes, donde la disminución de la hormona produce una disminución de GSH haciéndolas más susceptibles al estrés oxidativo **(Yoshida, 1996)**.

Otra condición que está asociada a la transcripción de la subunidad catalítica de la GCL es un rápido crecimiento de hepatocitos. Este crecimiento puede estar estimulado luego de una hepatectomía parcial o bien por la muerte de hepatocitos luego de una lesión hepática aguda. Este aumento en la transcripción se produce por la acción del factor de crecimiento de hepatocitos que actúa como un mitógeno e induce la expresión de ambas subunidades de la enzima GCL (Yang *et al.*, 2010).

La síntesis de GSH (Figura 5) sólo ocurre en el citoplasma, sin embargo, en las células eucariotas, GSH se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, incluyendo al núcleo (Diaz Vivancos *et al.*, 2010). El transporte entre los diferentes compartimentos celulares es fundamental para la regulación de la proliferación celular. Dentro de las células, GSH se encuentra predominantemente en su forma reducida, excepto en el lumen del retículo endoplasmático donde existe sólo en su forma oxidada (GSSG).

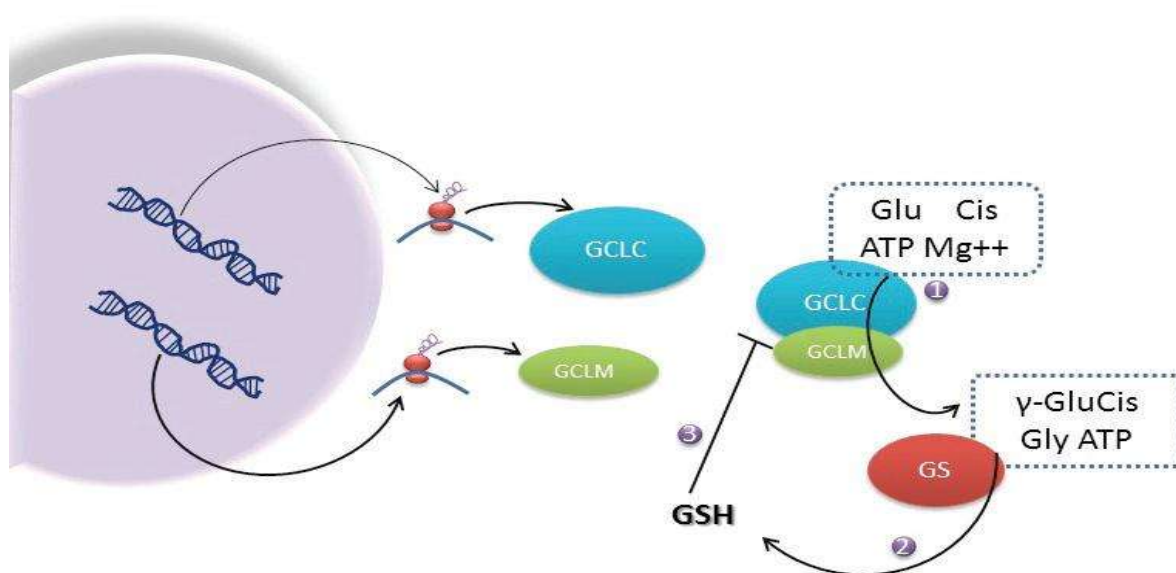


Figura 5. Esquema de la síntesis de GSH. El primer paso en la síntesis de GSH es llevado a cabo por la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL), que está compuesta por una subunidad catalítica (GCLC), y una subunidad moduladora (GCLM). 1. En un paso que limita la velocidad de la síntesis de GSH, GCLC liga cisteína y glutamato para formar el dipéptido g-L-glutamyl-L-cisteína. 2. El segundo paso es llevado a cabo por la enzima glutatión sintetasa (GS) que une glicina a g-L-glutamyl-L-cisteína. Ambos pasos son dependientes de ATP. 3. Retroalimentación negativa de GSH sobre la actividad de GCL. (Tomado de Acta Bioquím Clín Latinoam, 2013).

Entre un 10 a un 15% del GSH intracelular se encuentra en la mitocondria donde alcanza una concentración de 10 a 12 mM (Garcia-Ruiz *et al.*, 1995) en tanto que en el

citosol la concentración es de 7 mM (**Kaplowitz *et al.*, 1985**). Esta diferencia de concentración se debe a que en el interior de la mitocondria no se encuentra la enzima catalasa, por lo tanto, GSH es el encargado de inactivar el peróxido de hidrógeno generado durante los procesos oxidativos que ocurren en la matriz mitocondrial (**Pastore *et al.*, 2003**). Considerando el volumen de la matriz extracelular, la concentración de GSH mitocondrial es similar a la que se encuentra en el citosol. Las mitocondrias no poseen las enzimas que permiten la síntesis de GSH, por esta razón, todo el GSH que se encuentra en el compartimento mitocondrial proviene del citosol (**Yuang Kaplowitz, 2009**).

3.13.2.4 Glutación reductasa (GSH-Rd)

La glutatión reductasa es una flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del H_2O_2 y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos. La GSH-Rd es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad contiene 478 aminoácidos con un peso molecular de 51,569 Daltons (**Cisneros, 1995**). La actividad de la enzima GSH-Rd fue determinada siguiendo la oxidación del NADPH a $NADP^+$ durante la reducción del glutatión oxidado (GSSG).



3.13.2.5 Metabolismo del glutatión

El producto final de la oxidación de GSH es glutatión oxidado (GSSG, constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro, que es regenerado por la glutatión reductasa (GR), esta enzima transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo esta molécula. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR el glutatión no es consumido, pero es reciclado y así puede de nuevo ser utilizado cuando se requiera. Por otro lado, durante la generación de conjugados-S-glutatión por las glutatión-

S-transferasas (GST) o por la liberación de GSH por las células, el nivel total de GSH disminuye dentro de las células. Por lo tanto, el glutatión utilizado para esos procesos tiene que ser remplazado por síntesis de novo. El GSH extracelular y los conjugados-S-glutatión son sustratos para la ectoenzima γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT), esta enzima cataliza la transferencia del motivo γ -glutamilo del GSH (o de los conjugados-S-glutatión) a una molécula aceptora y por lo tanto, generando el dipéptido cisteinilglicina (o el conjugado-S-cisteinilglicina) y el γ -glutamiloconjugado. El dipéptido cisteinilglicina puede ser hidrolizado por ectopeptidasas a cisteína y glicina, aminoácidos que posteriormente pueden ser transportados por la célula a través de transportadores específicos y participar en la síntesis de novo de glutatión (**Dringen, 2000**).

3.13.3 Antioxidantes exógenos

Además de los efectos protectores de las defensas antioxidantes endógenas enzimáticas, el consumo de antioxidantes en la dieta es de gran importancia (**Ames *et al.*, 1993**).

3.13.3.1 Polifenoles

El consumo de frutas, verduras y bebidas ricas en polifenoles, es benéfico para la salud humana. Los polifenoles de la dieta representan una amplia variedad de compuestos que se producen en las frutas, hortalizas, vino, té y chocolate. Contienen flavonas, isoflavonas, flavonoides, catequinas y ácidos fenólicos. Actúan como agentes que tienen efectos anti-oxidantes, anti-apoptosis, anti-envejecimiento, anti-cancerígeno, anti-inflamatorio y anti-aterosclerótico (**Vasudevan *et al.*, 2011**).

3.13.3.2 Vitaminas

La vitamina E o α -tocoferol, es un antioxidante liposoluble, supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos (**Pérez-Jiménez, 2007**). Esta vitamina tiene la capacidad de reaccionar con radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$); durante esta reacción se genera un nuevo radical más estable que el que había inicialmente, debido a la existencia de un anillo aromático. Por esta capacidad para evitar la propagación de la

oxidación lipídica tiene una función importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana **(Fernández y Montoya, 2003)**.

La vitamina C es un antioxidante soluble en agua **(Vasudevan et al., 2011)**. Su capacidad para actuar como antioxidante, se debe a que al reaccionar con radicales libres, fundamentalmente radicales peroxilo, los neutraliza y se transforma en radical dehidroascorbato, menos reactivo que los radicales libres que existían previamente **(Fernández y Montoya, 2003)**.

Los carotenoides son pigmentos naturales, tetrarpenoides sintetizados en plantas y otros organismos fotosintéticos, así como en algunas bacterias no fotosintéticas y levaduras. Pueden captar radicales peroxilo, mediante transferencia de electrones o sustracción de átomos de hidrogeno, mecanismo que lleva a la formación de una gran variedad de carotenoides radicalicos **(Fernández y Montoya, 2003)**. En tejido humano existen el β -caroteno, α -caroteno, licopeno y luteína **(Pérez Jiménez, 2007)**. El β -caroteno puede actuar como antioxidante durante la fase de rompimiento de la cadena, pero son menos eficaces que el α -tocoferol **(Vasudevan et al., 2011)**.

3.14 Las plantas como antioxidantes

Las plantas son una de las fuentes más prometedoras para descubrir nuevos agentes antioxidantes **(Martín y Ernest, 2003; Ziech et al., 2012; Saavedra-Molina et al., 2014)**. Entre los compuestos presentes en las plantas con mayor actividad antioxidante informada se encuentran: polifenoles (taninos, flavonoides, derivados del ácido cinámico, xantonas, cumarinas, lignanos, quinonas, carotenoides, estilbenos), aceites esenciales (terpenoides y aromáticos), ácidos grasos (saturados e insaturados), algunos alcaloides (derivados de la isoquinoleína) y otros compuestos como los carotenos, los ácidos benzoicos y ascórbicos, tocoferoles, el sitosterol y elementos minerales **(Bhaskar y Balakrishnan., 2009; Ebrahimzadeh et al., 2009)**. Estas sustancias sirven a la planta como mecanismo de defensa ante el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros **(Dixon, 2001)**.

3.15 *Justicia spicigera* Schechtendal

Es una especie de planta dicotiledónea, perene, con propiedades medicinales, perteneciente a la familia Acanthaceae (Tabla 7). Crece en climas cálido, semicálido, seco y templado, es cultivada en las casas y se asocia a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, subperennifolia, perennifolia, matorral xerófilo, bosques de encino y pino. Es endémica desde México a América central (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Colombia). En México crece en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luis Potosí, Valle de México, Veracruz, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán, Hidalgo y Michoacán (figura 6). También se le denomina: “trompetilla, muicle, muite y muite” (Martínez, 1992; Cevallos y Sergio, 1998; Arellano-Rodríguez, 2003; Mendoza-Zúñiga, 2010).

Tabla 7. Taxonomía de <i>Justicia spicigera</i>	
<i>Justicia spicigera</i>	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Acanthaceae</i>
Genero	<i>Justicia</i>
Especie	<i>J. spicigera</i>



Figura 6. Distribución geográfica de *Justicia spicigera*

3.15.1 Botánica de *Justicia spicigera*.

J. spicigera es una planta que se encuentra como arbusto de 1.5 a 2.5 m de altura, densamente ramificado, con hojas más largas que anchas. Las flores se encuentran agrupadas en la unión del tallo y la hoja en la parte terminal de la planta, comúnmente de color anaranjado, pero algunas veces rojo pálido en forma de tubos que terminan rasgándose, formándose un labio (**Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009**).

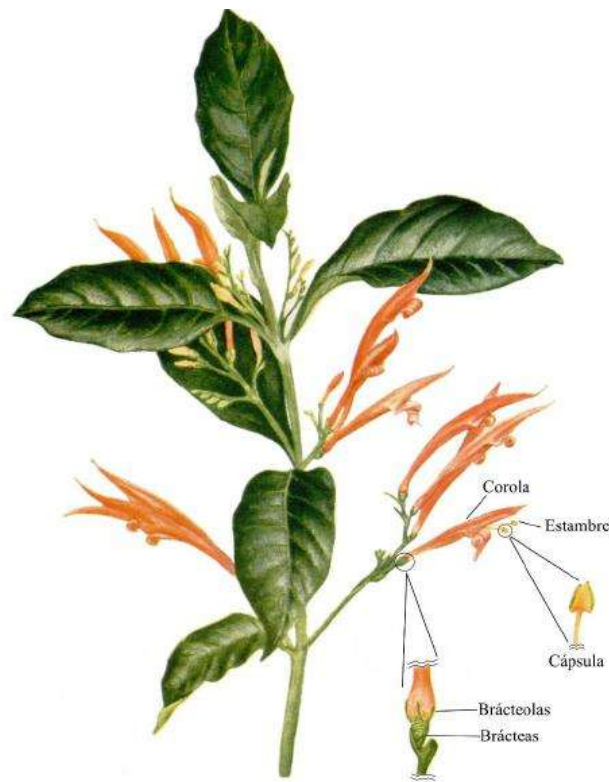


Figura 7. Parte aérea completa de *Justicia spicigera*



Figura 8. Hojas y flor de Justicia spicigera

3.15.2 Usos de *Justicia spicigera* en la medicina tradicional Mexicana

Desde la antigüedad, los seres humanos han utilizado semillas, raíces, tallos, flores y frutos de las plantas para la alimentación y aliviar los trastornos, debido a la eficacia de su curación, disponibilidad y bajo costo. Un gran número de compuestos químicos activos, (desde el punto de vista terapéutico), se han extraído de plantas como *Justicia spicigera* que se le ha detectado más de 23 usos para diferentes afecciones, malestares y enfermedades en diferentes formas de ser ingeridas sus partes sin presentar contraindicaciones en su uso. El extracto etanólico de las hojas de *J. spicigera* ha demostrado actividad contra *Giardia duodenalis*, uno de los parásitos intestinales más comunes en México asociado con diarrea (Ponce-Macotella *et al.*, 2001).

3.15.3 Estudio fitoquímico de *Justicia spicigera*

Los metabolitos secundarios presentes en plantas con propiedades hipoglucémicas pertenecen a los grupos: terpenos, carotenoides, alcaloides, esteroides, taninos, polisacáridos, cumarinas, esteroides, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides (Andrade-Cetto y

Heinrich, 2005). *J. spicigera* produce metabolitos secundarios del tipo fenólico, como taninos, lignanos y flavonoides (**Martínez, 1996**). Se han reportado en hojas de *J. spicigera*: alantoina, flavonoides como la kaempferitrin y su bis-ramnósido kaempferol (**Euler et al., 1982**), terpenoides como el β -glucosil-O-sitosterol y la criptoxantina (caroteno) (**Domínguez et al., 1990**). La alantoína es un producto del metabolismo de las purinas. Su principal efecto es ser un fuerte estimulador de la proliferación celular y reconstrucción de tejido (**Yardim-Akaydin et al., 2004**). El kaempferol (Figura 9), es un flavonoide natural que se encuentra presente en las hojas de *J. spicigera*, es un antioxidante potente que ayuda a prevenir el daño oxidativo de las células, lípidos y ADN, además de prevenir la arteriosclerosis (**Watell et al., 2003**), además de que ha mostrado propiedades hipoglucémicas en ensayos *in vitro* e *in vivo* (**De Sousa et al., 2004**). También actúa como agente quimiopreventivo, demostrando así ser el principal inhibidor de la formación de cáncer en las células (**Wang et al., 2005**). López-Sánchez et al., 2007 mencionan que el kaempferol ayuda a prevenir la aterosclerosis inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la agregación de plaquetas en la sangre. Zheng et al. (2001), demuestran que el kaempferol puede tener beneficios para las personas que tienen riesgo de cáncer, ya que en líneas celulares pancreáticas (MIA PaCa-2 y Panc-1) se muestra un efecto anti-cáncer. El β -sitosterol es el esteroide más abundante en las plantas como *J. spicigera*, contiene un grupo β -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol, lo que lo hace más lipofílico, también presenta actividad inmunológica y anti-inflamatoria (**Bouic 1996, 1999, 2001; Gómez, 1999**). Así mismo, se ha demostrado su efectividad clínica como hipocolesterolémico, así como en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (**Becker et al., 1993; Pelleiter et al., 1995; Berges et al., 1995; Gerber, 2002; Tapiero, 2003**). Los lignanos también se han identificado en el género *Justicia* y tienen la capacidad de captar radicales libres, antiviral, antitumoral, hipoglucémico, antiobesidad y cardioprotectoras (**Smeds et al., 2012**).

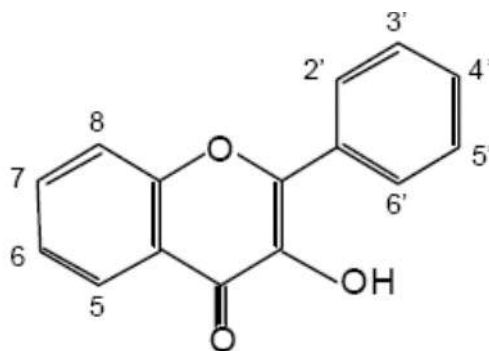


Figura 9. Estructura química del kaempferol

Sepúlveda *et al.*, 2009 analizaron la parte aérea de *J. spicigera* y para un mismo órgano de la planta, obtuvieron que los extractos preparados con metanol poseen una mayor actividad captadora de radicales libres, mayor cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides.

El contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos depende de las condiciones del disolvente o de extracción utilizados (**Ares *et al.*, 2010; Serrano-Maldonado *et al.*, 2011**).

La sinergia entre los compuestos químicos genera actividad antioxidante que no depende sólo de la concentración y la estructura de cada uno, sino que la interacción con otros elementos de la mezcla es otro factor que también puede contribuir a la actividad captadora de radicales (**Castro *et al.*, 2006**). Todos los extractos de *J. spicigera* son una fuente con actividad de eliminación de radicales libres, pero esta actividad cambia con el disolvente utilizado para preparar el extracto (**Sepúlveda *et al.*, 2009**).

4.0 Justificación

El estrés oxidativo causado por la hiperglucemia, aumenta las posibilidades de padecer complicaciones en órganos no insulino dependientes como el hígado. Estudios anteriores han demostrado que el extracto etanólico de *Justicia spicigera* posee efecto hipoglucémico y antioxidante que podría disminuir el estrés oxidativo y prevenir la aparición de hepatopatías. Por lo que es de nuestro interés evaluar la capacidad antioxidante y los efectos de esta planta en hígado de ratas diabéticas.

5.0 Hipótesis

El extracto etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* reduce el daño oxidativo en el hígado de ratas diabéticas y normaliza los valores de los perfiles hepático y lipídico.

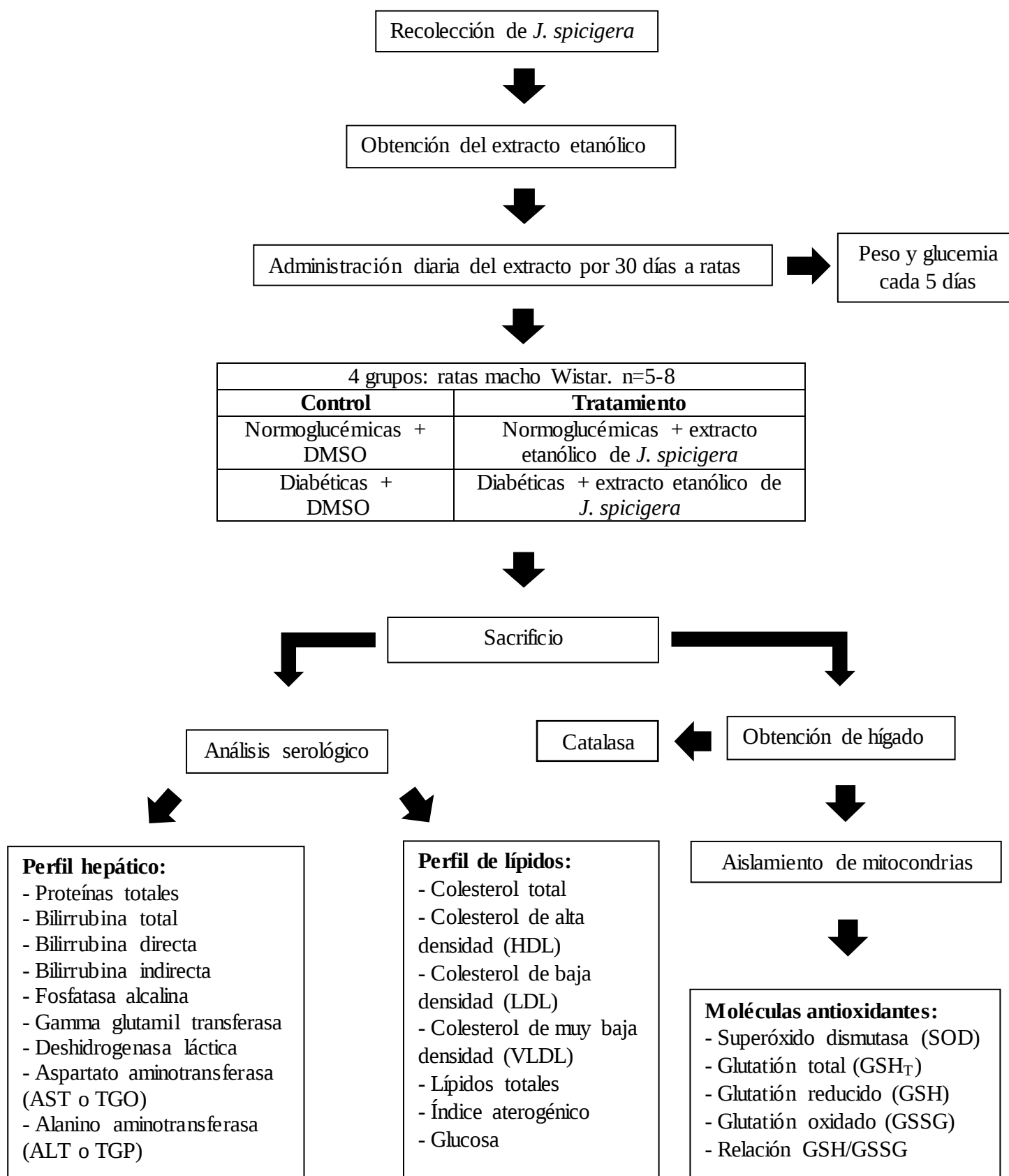
6.0 Objetivo general

Analizar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en hígado y suero de ratas diabéticas.

6.1 Objetivos específicos

- 1.- Estudiar los parámetros del perfil lipídico en suero de ratas diabéticas.
- 2.- Estudiar los parámetros serológicos de función hepática de ratas diabéticas.
- 3.- Analizar las moléculas antioxidantes en hígado de ratas diabéticas.

7.0 Diseño experimental



8.0 Materiales y métodos

8.1 Identificación y recolección de la planta *Justicia spicigera*

La planta fue colectada en los meses de abril y mayo del invernadero del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

8.2 Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Justicia Spicigera*

Una vez identificada y colectada la planta, se procedió a deshojarla (colectando solo las hojas que estuvieran en buen estado), se lavaron con agua, se quitó el exceso de agua y se pesaron para preparar el extracto en relación 1:10 (p/v). Se dividieron en grupos individuales rotulados y se congelaron a -80°C por 24 h. Pasadas las 24 horas de congelación, se trituraron las hojas con una licuadora industrial Oster y para la maceración se embazaron en frascos ámbar con etanol por 6 días en refrigeración a 4°C y agitándose una ocasión cada 24 h. Posteriormente, se filtró el extracto y se desechó el material vegetal. El filtrado se concentró en rotavapor a 55°C y se preparó a una concentración de 100 mg/kg taje de rendimiento del extracto, y se disolvió, con dimetil sulfóxido (DMSO) al 5%.

8.3 Animales

La administración del extracto se realizó con uso de una sonda orofaríngea administrando 1 ml diario por 30 días. Se utilizaron ratas de la cepa Wistar machos con un peso de entre 380-400 g, las cuales fueron mantenidas en condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz-obscuridad de 12/12 horas, alimentadas con una dieta estándar para roedores y agua purificada de acceso libre.

8.3.1 Inducción a la diabetes

A los animales se les privó de alimento la noche anterior a su inducción, la cual se realizó con una inyección de estreptozotocina (STZ) intraperitoneal (50 mg/kg) disuelto en

buffer de citrato (pH 4.5). A las ratas control solo se les administró el buffer de citrato; 5 días después de la inyección de la STZ se les midió la glucemia para confirmar la diabetes. Las ratas diabéticas que presentaron los niveles de glucemia >300 mg/dl se seleccionaron para el análisis.

8.3.2 Determinación de los niveles de glucemia y peso durante el tratamiento

Los niveles de glucosa en sangre se determinaron utilizando el micro método de glucosa-oxidasa. Para esto se empleó un equipo glucómetro Accucheck Performa.

La determinación de la glucosa sanguínea se realizó individualmente en cada uno de los animales después de haber permanecido de 12 horas sin alimento; y con ayuda de una lanceta metálica estéril se hizo punción en la vena caudal de la cola del animal para exponer una gota de su sangre sobre una tirilla reactiva especial para la determinación. El peso corporal de las ratas de cada grupo se registró cada 5 días durante el tratamiento. El porcentaje de peso del hígado fue determinado con relación al peso corporal.

8.3.3 Registro de la ingesta de alimento y agua durante el tratamiento

Durante el periodo experimental (30 días), diariamente se registró el consumo de alimento y agua.

8.3.4 Evaluación de las muestras sanguíneas

Concluidos los 30 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previo ayuno. Las muestras sanguíneas obtenidas fueron colocadas en tubos secos dejando coagular la sangre y posteriormente se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 minutos para obtener el suero, al cual se le realizaron las pruebas de perfil de lípidos y de función hepática.

8.3.4.1 Cuantificación de los parámetros de perfil de lípidos

El perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos, lípidos totales e índice aterogénico), fue determinado en suero usando el equipo de química seca DRI-CHEM NX500i que utiliza placas de múltiples capas que cuantifican enzimas y productos químicos generales, utilizando método colorimétrico.

8.3.4.2 Determinación de los parámetros de función hepática

Las pruebas de funcionamiento hepático o perfil hepático (proteínas totales, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, deshidrogenasa láctica, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa, aspartato amino transferasa y alanino amino transferasa), se determinaron utilizando el equipo de química seca DRI-CHEM NX500i con el mismo fundamento que en las pruebas del perfil lipídico.

8.4 Aislamiento de mitocondrias de hígado

Las mitocondrias de hígado fueron aisladas empleando la técnica modificada descrita por Saavedra-Molina y Devlin (1997). El hígado fue obtenido mediante una incisión en el abdomen y fue colocado en 25 mL de medio 1 (Manitol 220 mM, Sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, EGTA 1 mM, pH7.4) a 4°C, fueron homogeneizados empleando un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón impulsado con un motor. El homogenado fue centrifugado a 2,000 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue centrifugado a 7,500 rpm por 10 min. El precipitado (fracción mitocondrial) fue resuspendido en 2 mL de medio 2 (Sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, KH_2PO_4 40 mM y EDTA 30 mM; pH 7.2) y centrifugado a 9,000 rpm por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 1 mL de medio 2.

8.5 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial

La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret (**Gornall *et al.*, 1949**). Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen a una concentración de 0.3 mg/mL, que fue empleada en la determinación de la actividad de SOD y los niveles de GLUT en mitocondrias, y a una concentración de 0.8 mg/mL para la determinación de la actividad de CAT en homogenado.

8.6 Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

La actividad de la SOD fue determinada empleando un kit de análisis comercial (Sigma-Aldrich, USA), el cual permite analizar la actividad de la SOD mediante un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio Dojindo's altamente soluble en agua, WST-1 (Sal monosódica (2(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que produce un tinte formazan cuando es reducida por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. Las lecturas fueron tomadas a 400 nm empleando un lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader por métodos colorimétricos. La actividad de SOD fue expresada en % de actividad donde el 100 % equivale a 29.44 U/mg de proteína contenida en el grupo normoglucémico control.

8.7 Determinación de los niveles de glutatión total, reducido y oxidado

El análisis del nivel de GSH fue realizado empleando el lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader por métodos colorimétricos, la medición de GSH se basa en un ensayo cinético en que las cantidades catalíticas (nmolas) de GSH provocan una reducción de 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) y la GSSG formada se recicla por glutatión reductasa y NADPH. El GSSG también reacciona para dar un valor positivo a la reacción. El producto amarillo, ácido 5-tio-nitrobenzoico (TNB) se midió espectrofotométricamente a 412 nm. Los niveles de glutatión reducido se determinaron por reducción de DTNB a TNB sin la adición de

NADPH + H^+ y por diferencia fueron calculados los niveles de glutatión oxidado. Los niveles de glutatión se expresaron en nmoles/mg de proteína.

8.8 Determinación de la enzima catalasa en homogenado de hígado de rata

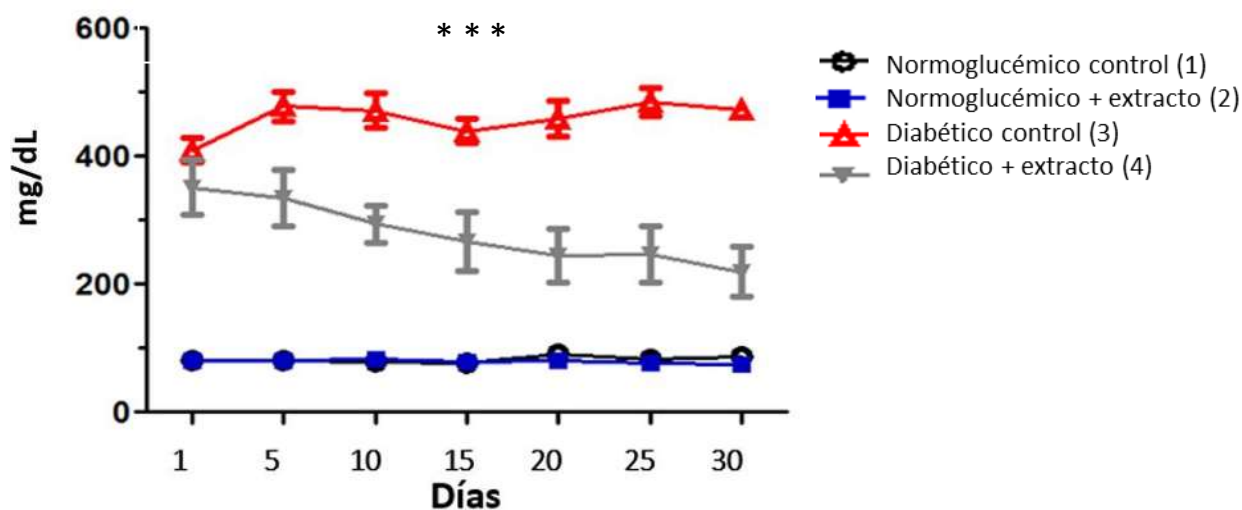
La actividad de CAT fue determinada por el método de Sinha (1972). El método está basado en la conversión del dicromato en ácido acético que es reducido en acetato crómico cuando se calienta en presencia de H_2O_2 , con la formación de ácido percrómico como un intermediario inestable. El acetato crómico así producido es medido colorimétricamente a 570 nm. Ya que el dicromato no tiene absorbancia en esa región, la presencia del compuesto en la mezcla de ensayo no interfiere del todo con la determinación colorimétrica del acetato crómico. La determinación de CAT se basa en la descomposición del H_2O_2 en diferentes periodos de tiempo. La reacción es detenida en 1 min por la adición de la mezcla de dicromato/ácido acético. El H_2O_2 restante es determinado por la medición colorimétrica de acetato crómico al calentar la mezcla. La actividad CAT se expresó como $\mu\text{mol de } H_2O_2 / \text{min} / \text{mg de proteína}$.

9.0 RESULTADOS

9.1 Establecimiento del modelo diabético

9.1.1 Glucemia

La inducción de la diabetes experimental fue confirmada por los niveles elevados de glucemia, disminución del peso corporal y los signos polifagia y polidipsia que presentaron los grupos diabéticos. Como se observa en la gráfica 2, el grupo normoglucémico control mantuvo niveles normales de entre 75 y 91 mg/dL de glucemia. El tratamiento durante 30 días con el extracto etanólico de *J. Spicigera*, no modificó los niveles de glucemia en el grupo normoglucémico tratado y en el caso del grupo diabético tratado los niveles de glucemia disminuyeron de manera significativa a lo largo del tratamiento, donde se logró una concentración de 219 mg/dL al final del tratamiento en comparación con el grupo diabético control que alcanza una concentración de 485 mg/dL de glucemia.



Gráfica 2. Niveles de glucemia durante el tratamiento con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg) (n=5-8). Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media $\pm$ EE. (n=5). *** $p < 0.001$ vs tratamiento.

9.1.2 Peso corporal

Los cambios en el peso de los animales fueron registrados en gramos (g) cada cinco días durante 30 días de tratamiento, como se puede observar en la tabla 8, el grupo normoglucémico control fue ganando peso a lo largo del tratamiento, llegando a un peso de 380 g y obteniendo una ganancia de peso del 2 %. Este aumento también se presentó en el grupo normoglucémico con extracto que inicio con un peso de 380 g y alcanzó un peso de 396 g al final del tratamiento, obteniendo una ganancia de peso del 4 %; por otro lado, los grupos diabético control y diabético tratado presentaron una disminución significativa del peso corporal, donde el grupo diabético control presentó un peso inicial de 373 g y un peso final de 314 g mostrando una disminución del 16 % de su peso corporal, mientras el grupo diabético con extracto que comenzó con un peso de 327 g, finalizó con un peso de 293 g, presentando una disminución del 10 % de su peso corporal. La pérdida de peso observada en los grupos diabéticos indica un buen establecimiento del modelo diabético.

Tabla 8. Porcentaje de ganancia de peso al término de la administración oral del extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg) durante 30 días.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (%)
Normoglucémico control (1)	371 ± 5	380 ± 8	+ 2
Normoglucémico + extracto (2)	380 ± 9	396 ± 9	+ 4
Diabético control (3)	373 ± 8	314 ± 12	- 16
Diabético + extracto (4)	327 ± 13	293 ± 28	- 10

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso). Los datos representan la media ± EE. (n=5-8).

9.1.3 Agua

En la tabla 9 Se representa el agua total consumida de manera diaria por grupo durante el tratamiento. El consumo de agua fue similar entre grupos normoglucémicos. En el grupo diabético, el consumo de agua fue mayor comparado con los normoglucémicos. En el grupo diabético tratado, el consumo aumentó de manera significativa en comparación al grupo diabético control.

9.1.4 Alimento

En la tabla 9 se puede observar que el grupo normoglucémico control mantuvo una ingesta diaria aproximada de 88 g de alimento y el grupo normoglucémico con extracto un consumo de 113 g; en tanto que los grupos diabéticos revelaron un consumo de alimento superior o polifagia donde, el grupo diabético control presento un consumo de 196 g de alimento por día, mientras que el grupo diabético con extracto mostró una tendencia a disminuir la ingesta diaria de alimento durante el tratamiento.

Tabla 9. Efecto del extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg) sobre el consumo de agua y alimento al término de la administración oral por 30 días.

Grupo	Consumo de agua (mL/grupo/día)	Consumo de alimento (g/grupo/día)
Normoglucémico control (1)	217.52 ± 3	87.48 ± 4
Normoglucémico + extracto (2)	220.33 ± 7	112.63 ± 2 **
Diabético control (3)	456.96 ± 15	240.65 ± 17
Diabético + extracto (4)	567.29 ± 9 ***	154.33 ± 4 ***

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso). Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media ± EE. (n=5). ** $p < 0.01$ vs tratamiento *** $p < 0.001$ vs tratamiento.

9.2 Perfil de lípidos

El efecto del extracto etanólico de *J. spicigera* sobre el perfil de lípidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Efecto del extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg) sobre el perfil lipídico al término de la administración durante 30 días. Concentración (mg/dL)

Grupo	Colesterol Total	HDL	LDL	VLDL	Triglicéridos	Lípidos totales
Normoglucémico control (1)	74.13 ± 5.8	44.00 ± 5.1	19.80 ± 3.7	22.00 ± 3.57	110.00 ± 17.83	331.43 ± 41.8
Normoglucémico + extracto (2)	75.40 ± 4.92	45 ± 3.03	14.56 ± 2.88	15.84 ± 0.92	79.22 ± 4.59	278.33 ± 13.28
Diabético control (3)	72.50 ± 5.16	45.50 ± 5.1	7.40 ± 1.7	34.47 ± 5.8	172.33 ± 29.33	440.70 ± 48.7
Diabético + extracto (4)	81.28 ± 2.86	40.75 ± 0.5	24.97 ± 3.85 *	15.86 ± 1.48 *	79.28 ± 7.41 *	289.54 ± 12.04 *

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso).

Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media ± EE. (n=5-8). * *p* < 0.05 vs tratamiento.

Tabla 11. Efecto del extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg / kg) en la determinación del índice aterogénico al término de la administración durante 30 días.

Grupo	Índice aterogénico
Normoglucémico control (1)	1.98 ± 0.36
Normoglucémico + extracto (2)	1.68 ± 0.06
Diabético control (3)	1.72 ± 0.16
Diabético + extracto (4)	2.00 ± 0.08

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso). Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media ± EE. (n=5-8).

9.2.1 Colesterol total, colesterol de alta densidad (HDL) e índice aterogénico.

Los resultados obtenidos en la determinación de colesterol total, colesterol-HDL (tabla 10) e índice aterogénico (tabla 11) en suero de ratas diabéticas y normoglucémicas no presentaron cambios significativos con la administración del extracto.

9.2.2 Colesterol de baja densidad (LDL)

Los resultados de LDL obtenidos en los grupos normoglucémicos no presentaron diferencias significativas. Mientras que el grupo diabético con extracto presentó niveles significativamente mayores al ser comparado con el grupo diabético control.

9.2.3 Colesterol de muy baja densidad (VLDL), triglicéridos y lípidos totales.

Los resultados obtenidos en los grupos normoglucémicos para la determinación de VLDL, triglicéridos y lípidos totales reflejaron una tendencia a disminuir con la administración del extracto, esta disminución se presentó de manera significativa en el grupo diabético tratado con EJS al ser confrontado con el grupo diabético control, indicando un efecto hipotrigliceridémico e hipolipemiente al ser administrado el extracto.

9.3 Perfil hepático

El efecto del extracto etanólico de *J. spicigera* sobre el perfil hepático se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Efecto del extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg) sobre el perfil hepático al término de la administración durante 30 días.

Grupo	Proteínas totales (g/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	Bilirrubina directa (mg/dL)	Bilirrubina indirecta (mg/dL)	Fosfatasa alcalina (U/L)	Gamma glutamil transferasa (U/L)	Deshidrogenasa láctica (U/L)	Aspartato amino-transferasa (U/L)	Alanino amino-transferasa (U/L)
Normoglucémico control (1)	7.18 ± 0.2	0.58 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.45 ± 0.06	277.33 ± 16.6	2.67 ± 0.7	5292.86 ± 494.05	417.29 ± 32.6	116.57 ± 3.4
Normoglucémico + extracto (2)	6.42 ± 0.2 *	0.34 ± 0.05 *	0.12 ± 0.02	0.22 ± 0.04 *	171.6 ± 16.8 **	1.20 ± 0.20	2658.50 ± 292.1 **	181.25 ± 15.3 ***	65.75 ± 1.03 ***
Diabético control (3)	7.87 ± 0.3	0.56 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.32 ± 0.05	1444 ± 53	13.60 ± 2.3	3052.50 ± 393.8	1540 ± 129.56	568 ± 148.71
Diabético + extracto (4)	5.70 ± 0.2 ***	0.35 ± 0.05 *	0.13 ± 0.03	0.23 ± 0.06	738 ± 81 ***	7.33 ± 1.86	2484 ± 413.3	338 ± 47.4 ***	220 ± 18.8

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso). Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media ± EE. (n=5-8). * $p < 0.05$ vs tratamiento. ** $p < 0.01$ vs tratamiento. *** $p < 0.001$ vs tratamiento.

9.3.1 Proteínas totales

Los resultados de proteínas totales obtenidos en el grupo normoglucémico control fueron comparados con los resultados del grupo normoglucémico tratado con el extracto, en donde se presentó una disminución significativa en este último grupo, mientras que los valores obtenidos por los grupos diabéticos mostraron una disminución significativa en el grupo diabético con extracto.

9.3.2 Bilirrubinas

9.3.2.1 Bilirrubina total

Los valores obtenidos en la determinación de bilirrubina total en los grupos normoglucémicos presentaron una disminución significativa con la administración del extracto. Esta disminución se puede observar de manera similar en los grupos diabéticos, donde el extracto redujo los niveles de bilirrubina.

9.3.2.2 Bilirrubina directa

Los valores obtenidos en la determinación de bilirrubina directa por los grupos normoglucémicos no muestran diferencias significativas. Sin embargo, mostraron una tendencia a disminuir en el grupo diabético con extracto al ser confrontado con su grupo diabético control.

9.3.2.3 Bilirrubina indirecta

Los valores de bilirrubina indirecta obtenidos en el grupo normoglucémico control fueron comparados con el grupo normoglucémico con extracto, estos resultados mostraron una disminución significativa en el grupo administrado con el extracto etanólico de *J. spicigera*.

Los grupos diabéticos fueron confrontados entre ellos y se mostró una tendencia a disminuir los niveles de bilirrubina indirecta en el grupo tratado con el extracto.

9.3.3 Fosfatasa alcalina

Las concentraciones de fosfatasa alcalina determinadas en el grupo normoglucémico tratado con extracto mostraron una disminución significativa en comparación al grupo normoglucémico control. Finalmente se hizo una comparación entre los grupos diabéticos mostrando una disminución significativa en el grupo diabético tratado.

9.3.4 Gamma glutamil transferasa (GGT)

El efecto de la administración del extracto en los grupos normoglucémicos reflejó una tendencia a disminuir los niveles de GGT. Este mismo efecto se presenta en los grupos diabéticos.

9.3.5 Deshidrogenasa láctica (DHL)

Los resultados de DHL obtenidos para el grupo normoglucémico control fueron comparados con los resultados obtenidos por el grupo normoglucémico con extracto mostrando una disminución significativa en las concentraciones obtenidas por el grupo administrado con el extracto. Los grupos diabéticos no presentaron diferencias significativas al ser comparados entre ellos mismos.

9.3.6 Aspartato amino transferasa (AST)

Los resultados obtenidos en la determinación de AST por el grupo normoglucémico control fueron confrontados con los resultados obtenidos por el grupo normoglucémico con extracto mostrando una disminución significativa con la administración del extracto. El grupo diabético tratado muestra que los resultados obtenidos son significativamente menores al ser comparado con el grupo diabético control.

9.3.7 Alanino amino transferasa (ALT)

Los resultados obtenidos en la determinación de ALT por el grupo normoglucémico control fueron confrontados con los resultados obtenidos por el grupo normoglucémico con extracto mostrando una disminución significativa con la administración del extracto. Los grupos diabéticos fueron confrontados entre sí, mostrando una tendencia a disminuir con la administración del extracto.

9.4 Peso del hígado

En la tabla 13 se puede apreciar que los animales diabéticos muestran un hígado de mayor peso, respecto a su peso corporal comparado con los controles. Podemos observar un aumento significativo en el grupo diabético tratado.

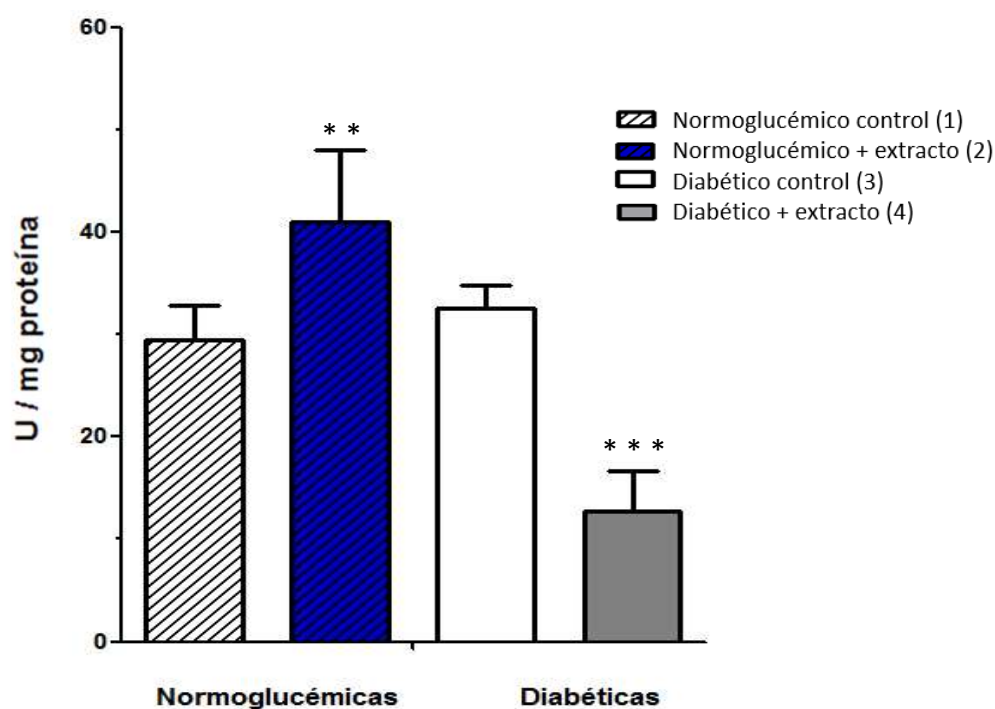
Tabla 13. Porcentaje de peso del hígado de ratas tratadas con el extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg) durante 30 días.

Grupo	% Peso del hígado (g) / Peso corporal (g)
Normoglucémico control (1)	3.46
Normoglucémico + extracto (2)	2.99
Diabético control (3)	3.86
Diabético + extracto (4)	4.42

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso). Los datos representan la media $\pm$ EE. (n=4-8).

9.5 Actividad de la superóxido dismutasa en mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas y diabéticas

Como se observa en la gráfica 3, el tratamiento con el extracto etanólico de *J. spicigera* aumentó de manera significativa la actividad de la SOD en el grupo normoglucémico con extracto en comparación al grupo normoglucémico control, sin embargo, disminuye de manera significativa en el grupo diabético con extracto al ser confrontado con el grupo diabético control.



Gráfica 3. Actividad de la SOD en ratas tratadas con el extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/Kg) durante 30 días. Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media $\pm$ EE. (n=4-8). ** $p < 0.01$ vs tratamiento, *** $p < 0.001$ vs diabético tratado.

9.6 Niveles de glutatión en mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas y diabéticas

Los niveles de glutatión se muestran en la tabla 14. Los resultados obtenidos para la determinación de glutatión total muestran que la administración del extracto etanólico de *J. spicigera* disminuyó los niveles de glutatión total en el grupo normoglucémico y diabético. Sin embargo, en la determinación de los niveles de glutatión reducido se presenta un aumento con la administración del extracto en los grupos que lo recibieron. Los resultados obtenidos con la relación de glutatión reducido con el oxidado presentan una tendencia a elevar los niveles de glutatión reducido sobre el glutatión oxidado en ratas administradas con el extracto etanólico de *J. spicigera*.

Tabla 14. Concentraciones de glutatión en hígado de ratas tratadas con el extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/kg) durante 30 días.

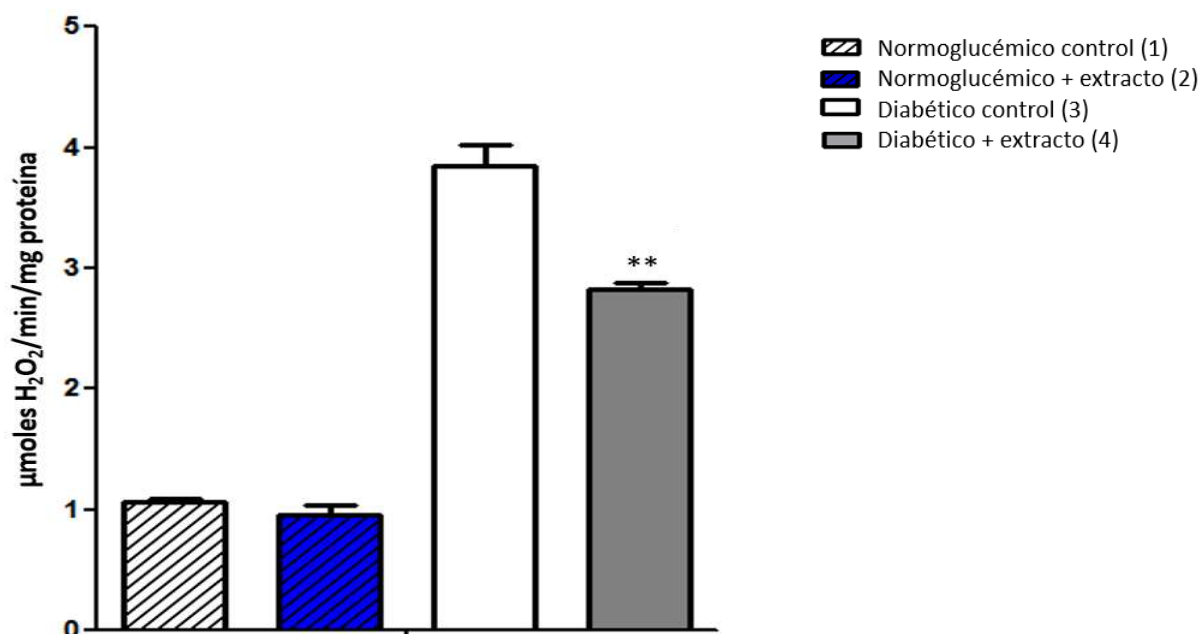
Grupo	Glutatión Total (nmolas/mg)	Glutatión Reducido (nmolas/mg)	Glutatión oxidado (nmolas/mg)	Relación GSH / GSSH
Normoglucémico control (1)	0.123	0.026	0.100	0.40
Normoglucémico + extracto (2)	0.083	0.040	0.100	0.08
Diabético control (3)	0.140	0.016	0.093	0.17
Diabético + extracto (4)	0.027	0.020	0.030	0.14

Los grupos 1 y 3 fueron administrados con DMSO. Los grupos 2 y 4 fueron tratados con extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/kg de peso). Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student (n=1-8).

9.7 Determinación de CAT en homogenado de hígado de ratas normoglucémicas y diabéticas

En la gráfica 4 está representada la actividad de CAT en μM H_2O_2 consumido/min/mg de proteína en homogenado de hígado de rata; donde se puede observar que el grupo normoglucémico control no presenta diferencias significativas al ser confrontado con el grupo normoglucémico tratado, sin embargo, si se presentó una

disminución significativa en el grupo diabético tratado al ser confrontado con el grupo diabético control.



Gráfica 4. Actividad de catalasa en ratas tratadas con el extracto etanólico de *J. spicigera* (100 mg/Kg) durante 30 días. Los valores obtenidos fueron analizados mediante prueba *t*-Student. Los datos representan la media $\pm$ EE. (n=4-8). ** $p < 0.01$ vs tratamiento.

10.0 DISCUSIÓN

Pacientes con DM presentan un aumento en el estrés oxidativo, así como en los procesos de inflamación, siendo mayores en aquellos que presentan complicaciones propias de la patología, caracterizadas por una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes y un incremento de los productos de oxidación (Kaneto *et al.*, 2010; Likidilid *et al.*, 2010; Takayanagi *et al.*, 2011). Por lo que para prevenir o controlar la aparición de complicaciones como son las hepatopatías en los pacientes diabéticos debe considerarse el consumo de un compuesto antioxidante que complemente el tratamiento. Por otro lado, existen reportes de la resencia de flavonoides como el kaempferitrin y su bisramnósido kaempferol en hojas de *J. spicigera* (Euler *et al.*, 1982). El kaempferol es un antioxidante potente que ayuda a prevenir el daño oxidativo de las células, lípidos y ADN (Watell *et al.*, 2003), además de que ha mostrado propiedades hipoglucémicas en ensayos *in vitro* e *in vivo* (De Sousa *et al.*, 2004). Por lo anterior, en este trabajo se consideró que el

extracto de *J. spicigera* podría tener un potencial como antioxidante y protector contra el daño oxidativo en la diabetes.

En estudios previos realizados con *J. Spicigera*, por García-Márquez *et al.* (2011), demostraron que los extractos obtenidos utilizando disolventes con mayor polaridad muestran una actividad de barrido de radicales, actividad más eficaz que la presentada por extractos obtenidos usando disolventes menos polares. Sepúlveda *et al.* (2009), analizaron la parte aérea de *J. spicigera* y obtuvieron que el extracto metanólico de la planta posee una mayor actividad captadora de radicales libres y mayor cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides. En este trabajo se emplearon las hojas de *J. spicigera* para obtener un extracto mediante maceración simple en etanol, en frío (4°C), ya que Ortiz-Andrade *et al.* (2012) demostraron que el extracto etanólico de *J. spicigera* ejerció un efecto hipoglucémico al ser administrado en animales con diabetes experimental.

En nuestro estudio se administró el extracto etanólico de *J. spicigera* durante 30 días por vía oral en ratas diabéticas inducidas por STZ a una concentración de 50 mg/kg.

Por razones desconocidas, *J. spicigera* estimula la captación de glucosa en células resistentes a la insulina (Ortiz-Andrade, 2012), los registros de los niveles de glucosa en sangre realizados cada 5 días tras un periodo de ayuno de 12 horas, mostraron que efectivamente, el extracto etanólico de *J. spicigera* posee la capacidad de disminuir los niveles de glucemia en ratas diabéticas (Gráfica 2). De igual manera, la capacidad de asimilación de glucosa que presenta el extracto podría explicar, el aumento en el porcentaje de ganancia de peso (Tabla 8) y la disminución en el consumo de alimento en el grupo diabético tratado al ser comparado con el grupo diabético control (Tabla 9), debido a que la principal fuente de energía volverían a ser los carbohidratos. Sin embargo, estos cambios no se presentaron en el consumo de agua (Tabla 9), quizá por la persistencia de la hiperglucemia.

Es frecuente que los pacientes con diabetes presenten la aparición combinada de hiperglucemia y dislipidemia (American Diabetes Association, 2012; Bardini *et al.*, 2012). Esto se debe a que cuando falta insulina, la enzima lipasa sensible a la insulina de las células adiposas experimenta una gran activación. Con ello, se hidrolizan los triglicéridos almacenados y se liberan enormes cantidades de ácidos grasos y de glicerol a

la sangre circulante. El exceso de ácidos grasos del plasma, junto con la falta de insulina, favorece la conversión hepática de algunos de los ácidos grasos en fosfolípidos y colesterol. Estas dos sustancias, junto con el exceso de triglicéridos producido al mismo tiempo en el hígado, se liberan hacia la sangre con las lipoproteínas **(Guyton, 2011)**.

En estudios previos, Sheweita *et al.* **(2015)** reportaron que los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total, LDL y VLDL se incrementaron en ratas diabéticas inducidas con STZ en comparación con la ratas control, mientras que en la determinación de HDL se presentó una disminución, manteniendo un modelo adecuado de diabetes, además observaron que en ratas administradas con extracto acuoso y etanólico de *Alhagi maurorum* se presentó una mejora en la relación LDL/HDL y una disminución de los niveles de triglicéridos y VLDL, debido a un componente que dicho extracto posee. En nuestro estudio los niveles de colesterol total obtenidos en ratas diabéticas control sugieren que el modelo diabético con un progreso de 30 días de la enfermedad no es suficiente para generar un aumento significativo de este parámetro, el cual comúnmente se observa elevado en la patología diabética. En cuanto a los grupos tratados podemos sugerir que el extracto etanólico de *J. spicigera* no participa en la síntesis de colesterol (Tabla 10). Esto se relaciona con los resultados obtenidos en la cuantificación de HDL, donde no se presentaron cambios significativos en ningún grupo (Tabla 10) y por tanto, no es de sorprender que en la determinación del índice aterogénico no existan cambios significativos entre grupos normoglucémicos y entre grupos diabéticos (Tabla 11).

Por otro lado, se observó un aumento significativo de VLDL en el grupo diabético control (Tabla 10), probablemente el aumento de las VLDL se deba a la excesiva producción de ácidos grasos en el hígado que son secretados como componentes de VLDL, esta situación metabólica también es la responsable del incremento de la síntesis hepática de los triglicéridos y la subsecuente hipertrigliceridemia **(Feingold et al., 1992)** que se observa en el grupo diabético control (Tabla 10). Mientras que los grupos tratados con el extracto etanólico de *J. spicigera* muestran una disminución en los parámetros de VLDL y triglicéridos (Tabla 10), reflejando a su vez un efecto hipolipidémico. Esta mejora podría deberse a la presencia de algún componente en el extracto etanólico de *J. spicigera*, capaz de normalizar los valores de triglicéridos y lípidos totales en diabetes.

Con respecto al porcentaje de peso del hígado / peso corporal, podemos observar que el grupo diabético tratado con extracto presenta un aumento en el peso del hígado con relación al peso corporal (Tabla 13), estos resultados son consistentes con los obtenidos por Noriega-Cisneros (2013) que sugieren que el aumento en el tamaño del hígado puede deberse a que el extracto administrado puede estar actuando a nivel hepático sobre el almacenamiento y movilización de lípidos y de esta manera modificar los lípidos sanguíneos, como ya ha sido reportado (Forbes, 2013).

Debido a que las enfermedades hepáticas son más frecuentes en la población diabética (Levinthal y Tavill, 1999), se llevó a cabo la presente investigación con el fin de evaluar el potencial efecto protector de *J. spicigera* en el hígado. La determinación de proteínas totales y de bilirrubina nos permiten identificar directamente cambios en la función del metabolismo, mientras que la actividad de las enzimas hepáticas en el plasma son marcadores confiables para evaluar el daño hepático (Amacher, 1998).

Como ya se sabe, la insulina facilita la síntesis de proteínas y evita su degradación (Guyton, 2011). En nuestro estudio, no se observó disminución en los niveles de proteínas séricas del grupo diabético control (Tabla 12). Estos mismos resultados fueron observados por Saso *et al.* (2000), quienes obtuvieron diferencias a los dos meses post-aplicación de STZ en ratas Sprague-Dawley; por otro lado en la determinación de este parámetro para ratas tratadas con el extracto se observó un aumento en el catabolismo proteico (Tabla 12).

La albúmina es la principal proteína producida por el hígado y puede ser alterada cuando hay daño hepático, estados catabólicos, desnutrición y pérdida de proteínas; además es la encargada de transportar numerosas sustancias endógenas como la bilirrubina. (Burke, 2002; Pincus, 2007). El aumento de la bilirrubina total y directa se presenta cuando existe alguna alteración a nivel de las vías biliares, en tanto que la elevación de la indirecta puede reflejar la presencia de hemólisis. En nuestra investigación los niveles de bilirrubina total, directa e indirecta se ven disminuidos con la administración del extracto en el grupo normoglucémico y diabético (Tabla 12).

La fosfatasa alcalina puede estar presente en otros órganos por lo que se requiere una prueba suplementaria para confirmar que el aumento de esta enzima proviene del sistema biliar o del hígado (Andrade, 2007; Contreras, 2003), es por ello que su medición

concomitante con la gamma glutamil transferasa es fundamental ya que la GGT proviene casi exclusivamente del hígado (**Kamath, 1996; Gopal, 2000**). Los resultados obtenidos en esta investigación indican colestasis y disfunción biliar en el grupo diabético sin tratamiento, puesto que ambas se encuentran aumentadas, sin embargo con la administración del extracto los niveles en estas determinaciones mejoran de manera significativa en la condición diabética y tienden a disminuir en ratas normoglucémicas (Tabla 12), estos resultados son consistentes con los obtenidos por Ebenezer, *et al.* (2015).

La ALT y la AST son los indicadores más comúnmente utilizados para evaluar la presencia de necrosis hepática (**Dufour *et al.*, 2000**), las transaminasas son sensibles pero poco específicas al daño de los hepatocitos. Siendo la ALT más específica que la AST, ya que no solo se encuentra en el hígado sino también en el músculo esquelético y cardíaco (**Dufour *et al.*, 2000; Kamath, 1996; Gopal, 2000**). Subash *et al.* (2006), obtuvieron un incremento en los niveles de ALT, AST y DHL en ratas inducidas con STZ en comparación con los controles, y observaron una disminución de estos valores con la administración de cinamaldehído, presentando valores muy cercanos a los normales. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en nuestra investigación para los parámetros de ALT y AST en ratas control sin tratamiento, en donde al ser administrado el extracto etanólico de *J. spicigera* se presentó una disminución significativa en ratas normoglucémicas y diabéticas (Tabla 12); sin embargo, los resultados obtenidos en la determinación de DHL para el grupo normoglucémico control mostraron un aumento significativo en comparación con el grupo diabético control, quizá esto se deba a la variedad de isoenzimas de DHL que pudieron ser determinadas en suero y que hacen de esta prueba poco específica. Por otro lado, se presentó una disminución de DHL en ratas tratadas para ambos grupos, lo que indica un efecto positivo con la administración del extracto (Tabla 12).

Cabe mencionar que existe un efecto hepatotóxico de la STZ. Ohaeri, 2001 observaron que ratas inducidas por STZ presentaban necrosis hepática. Por lo que el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina, ALT, AST y DHL en plasma pudo deberse también a la fuga de estas enzimas del citosol hepático al torrente sanguíneo (**Navarro *et al.*, 1993**). Sin embargo, el extracto etanólico de *J. spicigera* mostró actividad

hepatoprotectora frente a esta posible causa, reduciendo la actividad de estas enzimas en plasma.

Los niveles elevados de estrés oxidativo en los animales diabéticos se deben a la autooxidación de la glucosa, la glicación de las proteínas, la peroxidación de los lípidos, y la baja actividad de las enzimas antioxidantes **(Giugliano, 1996)**. Valores elevados de glucosa en la diabetes producen radicales de O_2^- e $OH^\cdot$ en presencia de iones de metales de transición que causan daño oxidativo a los lípidos de las membranas celulares, sin embargo, la extensión del daño parece ser específica, siendo más susceptible el tejido cardíaco, el tejido hepático o al tejido renal. El efecto dañino de O_2^- y $OH^\cdot$ puede ser contrarrestado por las enzimas antioxidantes SOD y CAT. Se ha demostrado un incremento de estas enzimas como posible mecanismo de respuesta en las primeras etapas de la diabetes **(Chung et al., 2009)**, no obstante, la intensa producción de este radical por un tiempo prolongado, agota la estimulación de la actividad enzimática ya que, el producto de la reacción puede inhibirla **(Bravo A, 2007)**, lo cual está asociado a altas concentraciones de CAT; aunado a lo anterior, la célula utiliza para la reducción de H_2O_2 las enzimas CAT y GPx **(Marklund, 1984)**. Con lo anterior podemos deducir que los valores obtenidos en nuestra investigación para la determinación de SOD en el grupo diabético control (Gráfica 3) puede deberse a la inhibición de la enzima por parte del H_2O_2 , ya que los niveles observados en CAT se encuentran aumentados en este grupo (Gráfica 4). Sin embargo, con la administración del extracto etanólico de *J. spicigera* en el grupo diabético, los niveles de ambas enzimas se aprecian disminuidos. Por otro lado la actividad de SOD aumenta con la administración del extracto en el grupo normoglucémico. lo cual podría deberse a la presencia de antioxidantes en *J. spicigera*.

El glutatión es un tripéptido con capacidad para reducir el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos y, por lo tanto, juega un papel fundamental en la protección contra el daño tisular causado por las especies reactivas de oxígeno **(Van Dam, 2001)**.

La insulina estimula la síntesis de GSH, esta situación es de gran relevancia en los pacientes diabéticos, donde la disminución de la hormona produce una disminución de GSH haciéndolas más susceptibles al estrés oxidativo **(Yoshida, 1996)**. Sin embargo en nuestro estudio, los niveles de glutatión total observados en los grupos control superan a los

valores obtenidos con su grupo tratado correspondiente (Tabla 14), quizá esto se deba a un intento del organismo por mantener la homeostasis entre oxidantes y antioxidantes frente al estrés oxidativo presente en la DM. Por otro lado, la relación GSH/GSSG indica la prevalencia (aunque no significativa) de Glutación en su forma oxidada (GSSG) en la mitocondria para los grupos tratados con el extracto (Tabla 14), y ya que, GSSG no puede ser utilizado por GPx para la reducción del H_2O_2 y de lipoperoxidos (L-COOH) los cuales son elementos tóxicos (Cisneros, 1995), por lo que no se observó un efecto benéfico en los grupos tratados con extracto etanólico de *J. spicigera* pues disminuye las concentraciones de glutación en su forma reducida.

11.0 RESUMEN DE RESULTADOS

- El modelo de diabetes en ratas fue establecido a través del monitoreo de los signos y síntomas característicos de la enfermedad, logrando una disminución de estos parámetros con la administración del extracto etanólico de *Justicia spicigera*.
- El perfil de lípidos mostró una disminución en los parámetros de VLDL, triglicéridos y lípidos totales con la administración del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en ratas diabéticas.
- El perfil hepático determinado en ratas diabéticas presentó una disminución significativa en las pruebas indicadoras de colestasis y necrosis, así como una mejora en la función metabólica del hígado con la administración del extracto etanólico de *Justicia spicigera*.
- El extracto etanólico de *Justicia spicigera* fue capaz de disminuir la actividad de enzimas antioxidantes en ratas diabéticas.

12.0 CONCLUSIÓN

El extracto etanólico de *Justicia spicigera* ejerce un efecto protector en el hígado de ratas diabéticas.

13.0 PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto antioxidante de *J. spicigera* empleando extractos con polaridad baja y polaridad media en hígado de ratas diabéticas.
- Analizar el efecto antioxidante del extracto etanólico de *J. spicigera* de hojas recolectadas en diferentes periodos durante un año en ratas diabéticas.
- Analizar cortes histológicos de hígado en busca de cambios que puedan estar relacionados con el aumento de tamaño de este órgano observado en ratas diabéticas que consumieron el extracto etanólico de *J. spicigera*.
- Determinar el perfil hepático y perfil lipídico empleando un modelo de diabetes con más tiempo de evolución y evaluar la capacidad antioxidante del extracto etanólico de *J. spicigera* en ratas que cursan con hepatopatías crónicas.

14.0 REFERENCIAS

Andrade-Cetto A, y Heinrich M. **2005**. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99(3): 325-348.

Andrade R J, Robles M, Fernández-Castañer A, López- Ortega S, López-Vega M C, Lucena M I. **2007**. Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: a challenge for gastroenterologists. *World J Gastroenterol*. 13 (3): 329-334.

Amacher D E. **1998**. Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs. *Regulat. Toxicol. Pharmacol*. 27: 119–130.

Ames B N, Shigenaga M K y Hagen T M. **1993**. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*. 90: 7915-7922.

American Diabetes Association. **2012**. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 (1): S64:S71.

Atlas de la Federación Internacional de Diabetes FID, 2015, 7ma Edición.

Bardini G, Rotella C M y Giannini S. **2012**. Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro-and macrovascular complications. *Rev Diabet Stud* 9 (2-3): 82-93.

Becker M, Staab D, von Bergmann K. **1993**. Treatment of several familial hypercholesterolemias in long childhood with sitosterol and sitostanol. *Journal of Pediatrics*. 122: 292-296.

Benito Peinado P A, Calvo Bruzos S C, Carmén Gómez C y Iglesias Rosado C. **2014**. Alimentación y nutrición en la vida activa: ejercicio físico y deporte. 1: 535-537.

Berges R R, Windeler J, Trampisch H J. **1995**. Senge, and the β -sitosterol study group Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*. 345: 1529-1532.

Bhaskar H V. y Balakrishnan. **2009**. *In Vitro* antioxidant property of *Laticiferous* plant species from Western Ghats Tamil Nadu, India. *Int. J. Health Res*. 2: 163-170.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. **2009**. Muicle.

Borgel L. Brantes M J. Briones, B G, Argandoña M M, Intriago A G, Inojosa R, Tapia Z R. **2001**. Protocolos para el manejo del paciente intoxicado. Santiago, Chile: Organización Panamericana de la salud. 2: 69-88.

Bouic P J, Etsebeth S, Liebenberg R W, Albrecht C F, Pegel K, Van Jaarsveld P P. **1996**. beta- sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *International Journal and Immunopharmacology*. 18(12): 693-700.

Bouic P J, Clark A, Lamprecht J, Freestone M, Pool E J, Liebenberg R W, Kotze D, van Jaarsveld PP. **1999**. The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *International Journal Sports Medicine*. 20(4): 258-262.

Bouic P J. **2001**. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years old. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 4: 471-475.

Bravo A, Araujo S, Vargas M E, Mesa J, Souki A, Bermúdez V, et al. **2007**. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 26(1):37-41.

Brownie M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **2001**. *Nature*. 414: 813-820.

Burke M D. **2002**. Liver function: test selection and interpretation of results. *Clin Lab Med*. 22: 377-390.

Camps D. **2010**. Estrés oxidativo y enfermedades. *Bioquímica del estrés oxidativo*. 1: 51-59.

Castro I A, Rogero M M, Junqueira R M y Carrapeiro M M. **2006**. 2,2-Diphenil-1picrylhydrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol*. 41: 59-67.

Ceballos G, Ramírez I, Calzada C C, Olivares I M. **2006**. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Rev Endocrinol Nutr*. 14 (4): 233-236.

Cevallos-Ferriz; Sergio R S. **1998**. Las plantas con flores. México. Ed. *Ciencias*. 52-57.

Contreras J, Poniachik J, Planzer M, Lazarte R, Smok G, Ok senberg D, et al. **2003**. Drug induced liver disease: clinical and pathological patterns in 33 cases. *Rev Med Chil*. 131 (10):1128-1134.

Chung I M; Kim M Y, Park W H, Moon H I. **2009**. Antiatherogenic activity of *Dendropanax moribifera* essential oil in rats. *Pharmazie*. 64(8): 547-549.

De Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Silva, F.R. **2004**. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J. Nat. Prod*. 67: 829-832.

Díaz-Hernández D P, Burgos-Herrera L C. **2002**. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA*. 15: 179-189

Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó F V, Foyer CH. **2010**. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J*; 431 (2): 169-78.

Dixon R. **2001**. Natural Products and Plant Disease Resistance. Macmillan Magazines Ltd. *Nature*. 411: 843-847.

Domínguez X A, Achenbach H, González C, Ferré-D Amore A R. **1990**. Estudio químico del “muñile” (*Justicia spicigera*). *Revista Química Latinoamericana. Rev. Latinoam. Quím.* 21: 142-143.

Dufour R, Lott J, Nolte F, Gretch D, Koff R, Seeff L. **2000**. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance Characteristics of laboratory test. *Clin Chem*. 46: 2027-2049.

Dringen R, Gutterer J M, Hirrlinger J. **2000**. Glutathione metabolism in brain, metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*. 267: 4912-4916.

Druker R. **2005**. Metabolismo de Carbohidratos: Gluconeogénesis. Fisiología Médica. El manual moderno. 469-471.

Ebenezer Tunde Olayinka, Ayokanmi Ore, Olaniyi Solomon Ola, Oluwatobi Adewumi Adeyemo. **2015**. Ameliorative Effect of Gallic Acid on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Injury and Hepatic Dysfunction in Rats. *Med. Sci*. 3:78-92.

ENSANUT. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2012. Salud Pública México 2012.

Euler KL, Alam M. **1982**. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*. 45: 220-221.

Feingold K R, Grunfeld C y Pang M. **1992**. LDL Subclass phenotypes and triglycerides metabolism in noninsuline-dependent diabetes. *Arterio Thromb*. 12: 1446-1450.

Fernández E, Fernández E, Moreno I y Moreno M. **2008**. Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & Laboratorio*. 14: 11-12.

Fernandez P y Montoya P. **2003**. Alimentos de más interés en la población por su contenido antioxidante. 1: 20-29.

Forbes J M y Cooper M E. **2013**. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1): 137-88.

Ganda O P, Rossini A A y Like A A. **1976**. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes* 25: 595-603.

García-Márquez E, Román-Guerrero A, Perez-Alonso C, Cruz-Sosa F, Jiménez-Alvarado R, Vernon-Carter E J. **2012**. Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muntjac extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de ingeniería Química*. 11(1):1-10

Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernandez- Checa JC. **1995**. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor kappa-b: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 48 (5): 825-34

Gerber G S. **2002**. Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Current Urology Reports*. 3: 285-291.

Giugliano D, Ceriello A, y Paolisso G. **1996**. "Oxidative stress and diabetic vascular complications," *Diabetes Care*. 19(3): 257-267.

Gómez Q L E, Cuevas D B. **2008**. Superóxido dismutasa, In: Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médicas. Königsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 169-182.

Gopal D V, Rosen H R. **2000**. Abnormal findings on liver function tests. Interpreting results to narrow the diagnosis and establish a prognosis. *Postgrad Med*. 107: 100-102, 105-109, 113-104

Gornall A G, Bardawill G J y David M M. **1949**. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J Biol. Chem*. 177: 751-760.

Guzmán A M, Velázquez A y Sierra M P. **2006**. Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Rev Endocrinol Nutr*. 14 (4): 227-232.

Guyton & Hall. **2011**. Metabolismo de los lípidos en: Tratado de fisiología médica. Elsevier, España. 819-829.

Halliwell B. **2006**. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 141; 312-322.

Hicks J J, Torres Y D y Sierra M P. **2006**. Estrés oxidativo. Concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr*. 14 (4): 223-226.

Kamath P S. **1996**. Clinical approach to the patient with abnormal liver test results. *Mayo Clin Proc*. 71: 1089-1094; quiz 1094-1085

Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T A. **2010**. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm*: Article ID 453892,1 pages, doi:10.1155/2010/453892.

Kaplowitz N, Tak Yee A W, Ockhtens M. **1985**. The regulation of hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 25: 715-44.

Karre L, Lopez K y Getty G J K. **2013**. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*. 94: 220-227.

Kew M. **2000**. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet*. 355: 591-592.

Klein S, Wadden T y Sugerman H J. **2002**. AGA technical review on obesity. *Gastroenterology*. 123: 882-932.

Koya D, King G L. **1998**. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 47(6): 859-866.

Krinke, G J. (2000).The laboratory rat, en: Rutes of administration, Metabolism digest Sistem Urinary. Londres, Inglaterra: Academic Press pp. 253-67; 359-88; 385-400.

Krishnaiah D, Sarbatly R y Nithyanandam R. **2011**. A review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. *Food Bioprod Process*. 8: 217-233.

Levinthal G N y Tavill A S. **1999**. "Liver disease and diabetes mellitus," *Clinical Diabetes*. 17(4):14.

Likidlilid A, Patchanans N, Peerapatdit T y Sriratanasathavorn C. **2010**. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai*. 93(6):682-693.

López P, Cubillos LA, Chinchilla MA y Acevedo IC. **2001**. Endotelio. Célula generadora de radicales libres. *Acta Med Colomb*. 26 (4): 166-168.

López-Sánchez C, Martín-Romero F J, Fei-Sun L L, Samban-Arias A K, García-Martínez V. **2007**. Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in at brain. *Brain Research*. 1182: 123-137.

Luque M. **2011**. Diabetes Mellitus. en: Manual CTO de medicina y cirugía. CTO Editorial, España. 83-107.

Mann J I. **2002**. Diet and risk of coronary heart disease and tipe 2 diabetes. *Lanset*. 360: 783-789. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. **2003**. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 17(1): 24-38.

Marklund S L. **1984**. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J*. 220(1): 269-272.

Martín K W y Ernest E. **2003**. Herbal medicinesfor treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J. Antimicrob. Chemother*. 51: 241-246.

Martínez M. **1996**. Plantas medicinales mexicanas. Ed. Botas. México.

Marshall S, Bacote V y Traxinger R R. **1991**. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*. 266(8): 4706-4712.

Méndez, J D. **2003**. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Gac Med Mex*. 139: 49-54.

Mohamed A K, Bierhaus A, Schiekofer S, Ziegler R y Nawroth P P. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors*. **1999**. 10(2-3): 157-167.

Navarro C M, Montilla P M, Martin A, Jimenez J y Utrilla P M. **1993**. Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus. *Plant Med*. 59, 312–314.

Noriega-Cisneros R. Evaluación de la actividad hipoglucémica, hipolipidémica y antioxidante de *Eryngium carlinae* en ratas diabéticas. Tesis de Doctorado. **2013**. IIQB. UMSNH

Ohaeri O C. **2001**. Effect of garlic oil on the levels of various enzyme in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. *Biosci. Reprod*. 21: 19–24.

Ortiz-Andrade R, Cabanas-Wuan A, Arana-Argáez V E, Alonso-Castro A J, Zapata-Bustos R, Salazar-Olivo L A, Domínguez F, Chávez M, Carranza-Álvarez C, García-Carranca A. **2012**. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae) *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 455-462.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. **2003**. Analyses of Glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*. 333 (1): 19-39.

Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel F, Peerrin JL, Pages X, Debry G. **1995**. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Annals Nutrition and Metabolism*. 39: 291-295.

Peraza-Reyes L. **2008**. Catalasa, Radicales libres y estrés oxidativo, In: aplicaciones médicas. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 183-199.

Pérez Jiménez J. **2007**. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos 1: 7-15.

Pincus M R, Tierno P, Dufour D R. **2007**. Evaluation of liver function en Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Mcpherson, Pincus MR. 21 edition, Saunders Elsevier; China. 263-278.

Ponce-Macotella M, Rufino-González Y, de la Mora-de la Mora JI, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN. **2001**. Mortality and morohological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 44: 151-152.

Powers A. **2012**. Diabetes mellitus. Harrison. Principios de medicina Interna (Harrison, Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson, Lozano, eds). McGraw-Hill Interamericana editors, S.A. de C.V, China. 2968-3003.

Quintanar-Escorza M A y Calderón-Salinas J V. **2009**. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*. 28(3): 89-101.

Rodríguez J M, Menéndez J R, Trujillo Y. **2001**. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Milit*. 30 (1): 15-20.

Rogers A B, Dintzis SM. **2012**. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas. California, USA: Academic Press. 193-201.

Saavedra-Molina A, Salgado-Garciglia R, Noriega-Cisneros R, Esquivel-Gutierrez E. R, Manzo-Avalos S, Cortes-Rojó C y Montoya-Peréz R. **2014**. Oxidative Stress in Diabetes and Hypertension Treated with Alternative Theraphy of Medicinal Plants. In: *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation*, 1st ed. Angel Catalá. 285.

Saso L, Tommasino P, Italiano G, Grippa E, Leone M G, Gatto M T, Silvestrini B. **2000**. Changes of Acute-Phase Proteins in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Physiol. Res*. 49: 403-409.

Serrano-Maldonado M.J, Guerrero-Legarreta I, de la Paz Pérez-Olvera C. y Soriano-Santos J. **2011**. Antioxidant activity and citotoxic effect of *Cladocolea loniceroides* (vanTieghem) Kuijt (Loranthaceae). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10: 161-170.

Sharp, PE., Villano, J. **2013**. The laboratory rat. Florida, USA: CRC Press. 6-7, 25.

Shinha A K. **1972**. Colorimetric assay of catalase: *Anal. Biochem*. 47: 389-394.

Smeds I A, Eklund P C y Willfor S M. **2012**. Content, composition, and stereochemical characterisation of ligans in berries and sedes. *Food Chemistry*. 134 (4): 1991-1998.

- Subash Babu P, Prabuseenivasan S, Ignacimuthu. **2006**. Cinnamaldehyde-A potential antidiabetic agent. *Phytomedicine*. 14: 15-22
- Takayanagi R, Inoguchi T, Ohnaka K. **2011**. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*. 48 (1): 72-77.
- Tapiero H, Townsend D M, Tew K D. **2003**. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57: 321-325.
- Van Dam P S, Van Asbeck B S, Van Oirschot J F L M, Biessels G J, Hamers F P T, Marx J J M. **2001**. Glutathione and α -lipoate in diabetic rats: Nerve function, blood flow and oxidative state. *Eur J Clin Invest* 31:417-424.
- Vasudevan D M, Sreekumari S y Kannan V. **2011**. Radicales libres y antioxidantes. Texto de Bioquímica. 6; 236-241.
- Venereo J R. **2002**. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Milit*. 31 (2): 126-133
- Wang Y, Cao J, Weng J H, Zeng S. **2005**. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin accumulated human breast cancer cells, by high-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 328-333.
- Watell A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouillet C, Petit PJ, Fardelonne P, Brazier M. **2003**. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology* 65: 35-42.
- Yang H, Ierapetritou M G, Roth C M. **2010**. Effects of amino acid transport limitations on cultured hepatocytes. *Biophys Chem* 152 (1-3): 89-98.
- Yardim-Akaydin S, Sepici A, Ozkan Y. **2004**. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allantoin a Marker of Oxidative Stress?. *Free Radical Research* 38(6): 623-628.

Yoshida T. **1996**. Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 678 (2): 157-64.

Yuang L, Kaplowitz N. **2009**. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med.* 30(1-2): 29-41.

Zheng W, Shioow Y, Wang. **2001**. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural Food Chemistry.* 49: 11.