



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.

Facultad de Químico Farmacobiología.



TESIS:

Análisis de variaciones de las actividades de enzimas antioxidantes (SOD), (GPX), (GR), (GST), en tejidos animales diabéticos tras la administración crónica de extracto acuoso de hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*).

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN QUIMICO-FARMACOBIOLOGIA.**

P R E S E N T A:

QFB Said Alejandro Aguilar.

Directora de tesis:

Doctora en Ciencias Fisiológicas
Bertha Fenton Navarro.

**Morelia, Michoacán.
Noviembre. 2020.**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Glicobiología ubicado en la División de estudios de posgrado perteneciente a la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Bertha Fenton Navarro.

Apoyado por: CIC-UMSNH-2018, 2019 a la DC. Bertha Fenton Navarro.

COMITÉ TUTORAL.

DIRECTORA.

- D.C. BERTHA FENTON NAVARRO.

COMITÉ REVISOR DE TESIS.

- D.C. GRACIELA MARIA EUGENIA LETECHIPÍA VALLEJO.
- D.C. BERTHA FENTON NAVARRO.
- M.F.B. SARA ELIET URRUTIA HERNÁNDEZ.
- D.C. MARIA DE LOS DOLORES LÓPEZ CALVILLO.
- M.C. MANUEL LÓPEZ RODRIGUEZ.

AGRADECIMIENTOS.

El camino hasta ahora no ha sido sencillo, pero gracias al apoyo incondicional de mis padres, Roberto Alejandro Aguilar y Jovita Aguilar Servín, he podido salir adelante, los amo con todo mi ser.

A mi hermano Roberto Jared Alejandro Aguilar y a mi hermana Diana Paola Alejandro Aguilar, por su gran apoyo y por sus grandes consejos, además de que son mis dos principales motores para seguir adelante.

A mis abuelitos Simón Alejandro Chávez y María Santos Hernández Hernández, por todo su cariño y apoyo que me han brindado en este tiempo.

A la D.C Bertha Fenton Navarro, por todo su apoyo, consejos y paciencia que me brindo durante este proyecto.

A Cesar Xavier Rueda por todo el apoyo que me brindo.

ÍNDICE GENERAL.

Contenido

I.-Contenido.	15
1.1.1 Historia de la diabetes mellitus.	15
1.1.2 Problemática de diabetes en México.	15
1.1.3 Definición.	18
1.1.4 Síntomas.	18
1.1.5 Tipos de diabetes.	18
1.1.5.1.- Diabetes tipo I. (Insulino-dependiente).	19
1.1.5.2.-Diabetes tipo II (Insulino no dependiente).	19
1.1.5.3.- Diabetes Gestacional.	20
1.1.5.3.1 Complicaciones materno-fetales.	20
1.1.6 Complicaciones agudas.	21
1.1.6.1 Hipoglucemia.	21
1.1.6.2 Hiperglucemia.	22
1.1.6.2.1 Cetoacidosis diabética.	22
1.1.6.2.2 Estado Hiperosmolar Hiperglucémico.	22
1.1.7 Complicaciones Crónicas.	23
1.1.7.1 Retinopatía.	23
1.1.7.2 Nefropatía diabética.	23
1.1.7.2.1 Fisiopatología.	23
1.1.7.3 Neuropatía diabética.	23
1.1.8. Estrés oxidativo.	24
1.1.9. Radicales libres.	24
1.1.9.1. Fuentes de radicales libres <i>In vivo</i> .	25
1.1.9.2 Radicales libres derivados del oxígeno.	26
1.1.9.3. Anión superóxido.	26
1.1.9.4 Radical hidroxilo.	26
1.1.9.5 Especies reactivas del nitrógeno ERN.	27

1.1.10 Radicales libres y diabetes.	28
1.1.11. Sistema de defensa antioxidante.	28
1.1.11.1 Antioxidantes de tipo no enzimáticos.....	29
1.1.11.2 Flavonoides.	30
1.1.11.3 Estructura química.	30
1.1.11.4 Propiedades de las flavonas para la salud humana.	31
1.1.11.5 Mecanismos antioxidantes de los flavonoides.	32
1.1.11.6 Tipos y fuentes de flavonoides.....	32
1.1.12 Antioxidantes de tipo enzimático.	34
1.1.12.1 Superóxido dismutasa.	34
1.1.12.2 La familia de las SOD.	34
1.1.12.3 Reacción catalítica de las SOD.....	37
1.1.13. Glutación Peroxidasa.	38
1.1.14. Glutación reductasa (GR).....	39
1.1.15. Glutación Reducido (GSH).	40
1.1.15.1 Biosíntesis del glutatión.	41
1.1.15.2 Glutatión reducido y oxidado.....	41
1.1.16. Glutatión S transferasa.....	43
1.1.17. Tratamiento para la diabetes mellitus.	43
1.1.17.1 Medicamentos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.	46
1.1.17.2 Aumentan la secreción de insulina independiente del nivel de glucosa.	46
1.1.17.3 Disminuyen la insulino-resistencia.....	47
1.1.17.4 Disminuyen la excreción de glucosa.	48
1.1.17.5 Aumentan la secreción de insulina dependiente del nivel de glucosa y suprimen la secreción de glucagón.....	49
1.1.17.6 Análogos de amilina:	49
1.1.18. Acciones benéficas de los flavonoides para nuestro organismo.	51
II. Antecedentes	52
2.2.2 Compuestos hipoglucemiantes y antioxidantes de plantas medicinales.....	53
2.2.3 <i>Cuphea procumbens</i>	54
III. Justificación.	57
IV Hipótesis.	58

V. Objetivo general.	59
5.5.1. Objetivos particulares.	59
VI Materiales y métodos.	60
6.6.1 Cuantificación de Concentración de Proteína.	60
6.6.2 Inducción de Diabetes.	60
6.6.3 Procedimiento para tratar los órganos.	61
6.6.4 Cuantificación de enzimas.	61
6.6.4.1 Superóxido Dismutasa (SOD).	61
6.6.4.2 Glutación Peroxidasa (GPX).	61
6.6.4.3 Glutación transferasa (GST).	62
6.6.4.4 Glutación Reductasa (GR).	62
6.6.5 Análisis estadístico.	63
VII. Resultados.	64
7.7.1. Superóxido Dismutasa (SOD).	64
7.7.2. Glutación Peroxidasa (GPX).	71
7.7.3. Glutación Transferasa (GST).	76
7.7.4. Glutación Reductasa (GR).	82
VII. Discusión.	88
IX Conclusiones.	97
X. Perspectivas.	98
XI. Bibliografía.	99

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1	Distribución de casos notificados al SVEHDT2 por grupo de edad, México 2019.....	16
FIGURA 2	Distribución de casos de diabetes tipo 2 y unidades notificantes por entidad federativa SVEHDMT2-2020.....	16
FIGURA 3	Proporción de revisiones en los casos de DM2, SVEHDMT2-2020.....	17
FIGURA 4	Clasificación de la Diabetes mellitus.....	18
FIGURA 5	Complicaciones agudas.....	21
FIGURA 6	Estructura química de los flavonoides.....	31
FIGURA 7	Interacción entre radicales libres y antioxidantes.....	33
FIGURA 8	Relación estructura función de la SOD 3.....	36
FIGURA 9	Ciclo de Oxido-Reducción.....	40
FIGURA 10	Formula estructural del Glutation (GSH).....	40
FIGURA 11	Síntesis del Glutation.....	41
FIGURA 12	Glutation Oxidado y Reducido.....	42
FIGURA 13	Esquema general de reducción del anión superóxido.....	42
FIGURA 14	<i>Cuphea procumbens</i>	54
FIGURA 15	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en riñón	64
FIGURA 16	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en páncreas.....	66
FIGURA 17	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en corazón	67
FIGURA 18	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en hígado	69

FIGURA 19	Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en riñón.....	71
FIGURA 20	Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en páncreas.....	72
FIGURA 21	Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en corazón.....	73
FIGURA 22	Actividad de glutatión peroxidasa (GPX) en hígado.....	74
FIGURA 23	Actividad de glutatión transferasa (GST) en riñón.....	76
FIGURA 24	Actividad de glutatión transferasa (GST) en páncreas	77
FIGURA 25	Actividad de glutatión transferasa (GST) en corazón	78
FIGURA 26	Actividad de glutatión transferasa (GST) en hígado	80
FIGURA 27	Actividad de glutatión Reductasa (GR) en riñón.....	82
FIGURA 28	Actividad de glutatión Reductasa (GR) en páncreas	84
FIGURA 29	Actividad de glutatión Reductasa (GR) en corazón.....	85
FIGURA 30	Actividad de glutatión Reductasa (GR) en hígado.....	87

INDICE DE TABLAS

TABLA 1	Factores de riesgo para la DM2.....	20
TABLA 2	Ubicación y caracterización de la SOD.....	37
TABLA 3	Tipos de insulina y su acción.....	44
TABLA 4	Diferentes formas de administración de insulina.....	45
TABLA 5	Propiedades farmacocinéticas de las sulfonilureas.....	46
TABLA 6	Meglitinidas y características.....	47
TABLA 7	Medicamentos más utilizados en la DM2.....	50
TABLA 8	Concentración de polifenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de Cuphea Procumbens.....	55
TABLA 9	Concentración de flavonoides en extracto acuoso, acetónico y alcohólico de la hierba de la calavera	55
TABLA 10	Concentración de fenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de la hierba de la calavera.....	56

RESUMEN.

Antecedentes. Muchas enfermedades se asocian con el estrés oxidativo y la diabetes mellitus no es la excepción. Esta enfermedad, es un desorden metabólico caracterizado por altos niveles de glucosa (hiperglucemia) que genera un incremento de los radicales libres puede provocar alteraciones en los componentes celulares, generando cambios en sus funciones celulares. Las principales enzimas antioxidantes, se ven modificadas en la diabetes a pesar de tratamientos hipoglucemiantes, por lo que es indispensable la búsqueda de alternativas de apoyo para los tratamientos establecidos.

Objetivo. Evaluar el efecto de la administración del extracto acuoso de *Cuphea procumbens* (EACP) en la actividad de enzimas antioxidantes SOD, GPX, GR, GST, en riñón, hígado, corazón y páncreas de ratas Wistar con DM2.

Material y Métodos. Ratas Wistar con DM2. EACP. Distribuidas en tres grupos 2) control, 2) DM+M, 3) DM+EACP. Tratamiento crónico por 90 días. Reactivos con grado analítico. Métodos enzimáticos. SOD: método de Beyer, GPX método de Habig, GR; Sedlak y Lindsay.

Resultados. El EACP, redujo la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPX, GST, GR en los tejidos analizados a partir del día 30, siendo menor en el día 90. El grupo de ratas diabéticas tratadas con metformina, se observó que las actividades de las enzimas fueron comparables o menores al grupo de ratas sanas, pero con menor disminución en comparación con EACP.

Conclusión. La administración de EACP en modelos de ratas Wistar con diabetes mellitus tipo 2, mejora el estrés oxidativo, y reduce la actividad de enzimas antioxidantes.

Palabras clave: Estrés oxidativo, Diabetes mellitus, radical libre, enzimas antioxidantes, SOD, GPX, GR, GST, metabolitos secundarios.

ABSTRACT.

Background. Many diseases are associated with oxidative stress, and diabetes mellitus is no exception. This disease is a metabolic disorder characterized by high glucose (hyperglycemia) that generates an increase in free radicals that can cause alterations in cellular components, producing changes in their cellular functions. The main antioxidant enzymes are modified in diabetes despite hypoglycemic treatments, so it is essential to search for support alternatives for established medicines.

Aim. Evaluate the effect of the administration of the aqueous extract of *Cuphea procumbens* (AQECP) in the activity of antioxidant enzymes SOD, GPX, GR, GST, in kidney, liver, heart, and pancreas of Wistar rats with type 2 Diabetes mellitus (DM2).

Material and Methods. Wistar rats with DM2. EACP. Distributed in three groups 2) control, 2) DM + M, 3) DM + AQECP. Chronic treatment for 90 days. Reagents with analytical grade. Enzymatic methods. SOD: Beyer's method, GPX Habig's method, GR; Sedlak and Lindsay.

Results. The EACP reduced the activity of the antioxidant enzymes SOD, GPX, GST, GR in the tissues analyzed from day 30, being lower on day 90. The group of diabetic rats treated with metformin, it was observed that the activities of the enzymes were comparable or lower than the group of healthy rats, but with a smaller decrease compared to EACP.

Conclusion. EACP administration in Wistar rat models with DM-2 improves oxidative stress and reduces antioxidant enzymes.

Key words: Oxidative stress, Diabetes mellitus, Free radical, Antioxidant enzyme, SOD, GPX, GR, GST, Secondary metabolite.

ABREVIATURAS.

SIGLAS	SIGNIFICADO
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ATP	Trifosfato de adenosina.
CAT	Catalasa.
DM	Diabetes mellitus.
DM1	Diabetes mellitus 1.
DM2	Diabetes mellitus 2.
DMG	Diabetes gestacional.
EACP	Extracto acuoso <i>Cuphea procumbens</i> .
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
ERN	Especies reactivas de nitrógeno.
FLA2	FosfolipasaA2.
FID	Federación Internacional de Información y Documentación.
GAE/g	Equivalentes de Ácido Gálico
GPX	Glutación peroxidasa.
GR	Glutation reductasa.
GSH	Glutación reducido.
GST	Glutación transferasa.
HbA1c	Hemoglobina glicosilada.
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno.
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública.
IMC	Índice de masa corporal.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
IFN	Interferón.
IL	Interleucina.
kDa	Kilodalton.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
mg/dl	Miligramos por decilitro.

<i>mgQE/g</i>	Mg Equivalentes de Quercetina/g tejido
<i>NADH</i>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido.
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.
<i>NO⁻</i>	Anión nitroxilo.
<i>NO₂</i>	Dióxido de nitrógeno.
<i>ONOO⁻</i>	Peroxinitrito.
<i>OH⁻</i>	Radical hidroxilo.
<i>O₂⁻</i>	Anión Superóxido.
<i>OMS</i>	Organización mundial de la salud.
<i>RL</i>	Radical libre.
<i>RPM</i>	Revoluciones por minuto.
<i>SOD</i>	Superóxido dismutasa.
<i>TNF</i>	Factor de necrosis tumoral.
<i>VLDL</i>	Lipoproteína de muy baja densidad.

I.-Contenido.

1.1.1 Historia de la diabetes mellitus.

Desde 1535 A.C. en el papiro de Ebers, se describe una enfermedad que producía grandes cantidades de orina y en cual se hacían recomendaciones para su control; en el siglo II D.C. Areteo de Capadocia acuña el término diabetes, en el año 1679 queda reconocida la sintomatología de dicha enfermedad como entidad clínica por el medico ingles Thomas Willis él cual agrega el término “mellitus” (miel), para referirse a la característica dulce de la orina. (Velasco, B.J. et al 2014).

La OMS define a la DM como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre). (Diabetes Mellitus, OMS 2019).

Esta enfermedad se puede dividir en: DM1, de origen autoinmune, DM2, causada por resistencia a la insulina o deficiencia en la producción de la misma y diabetes gestacional, es un estado hiperglucémico “que se detecta por primera vez durante el embarazo. Sin la suficiente insulina, la glucosa se mantiene en la sangre y con el tiempo, este exceso puede tener complicaciones graves.

En la actualidad la DM ocupa a nivel mundial los primeros lugares en morbilidad y mortalidad. Su importancia radica en su carácter crónico-degenerativo a nivel orgánico. A ello se suma un alto costo económico para los servicios de salud y para el paciente, quien adicionalmente ve afectada su calidad de vida y la de sus familiares. (Velasco, B.J. et al 2014).

1.1.2 Problemática de diabetes en México.

En México, 8.6 millones de personas, de 20 años y más, reportan haber recibido un diagnóstico médico de diabetes, tres de cuatro mexicanos presentan un problema de sobre peso u obesidad. De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018 presentada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la Secretaría de Salud y el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). La encuesta da a conocer que la diabetes pasó de 6.4 millones a 8.6 millones. En México, al año fallecen cerca de 106 mil 500 personas por alguna complicación de la enfermedad, equivalente al 15.2% del total de los decesos registrados en el país, advierte el INEGI. (Granados, A.2019). En 2018 se registró una tasa de 411.85 casos de DM2 por cada 100 mil habitantes. (Unión Jalisco. 2019).

El estado de Tabasco reportó el mayor número de casos notificados en el cuarto trimestre de 2019 con un total de 3,596 casos (10.07%), seguido por el estado de Jalisco con 3,110 casos (9.3%). (DGE. 2019).

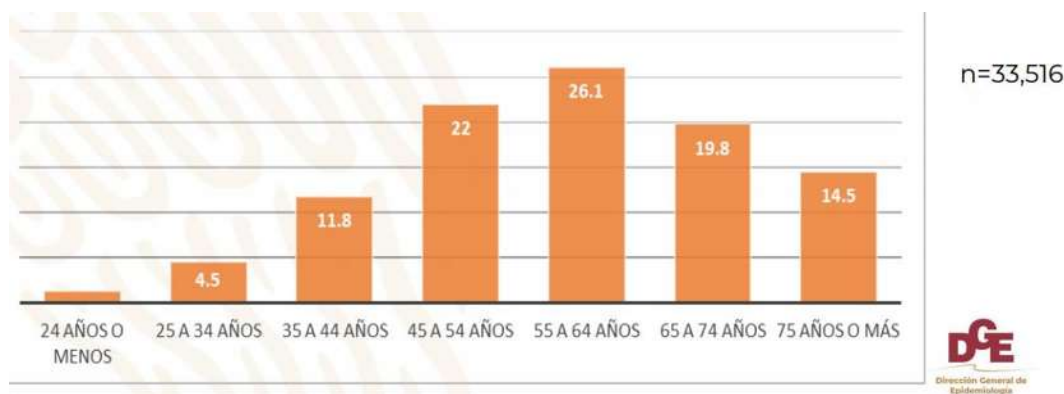


Fig. 1. Distribución de casos notificados al SVEHDT2 por grupo de edad, México 2019. (DGE. 2019).

El Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria de Diabetes Mellitus Tipo 2 (SVEHDMT2), el cual nos proporciona información útil, válida, confiable y actualizada de los pacientes con DM2 hospitalizados. Hasta el segundo trimestre del 2020, se registraron un total de 8,992 casos DM2, siendo los estados de Tabasco y Jalisco los que reportaron el mayor número. (DGE. 2020).

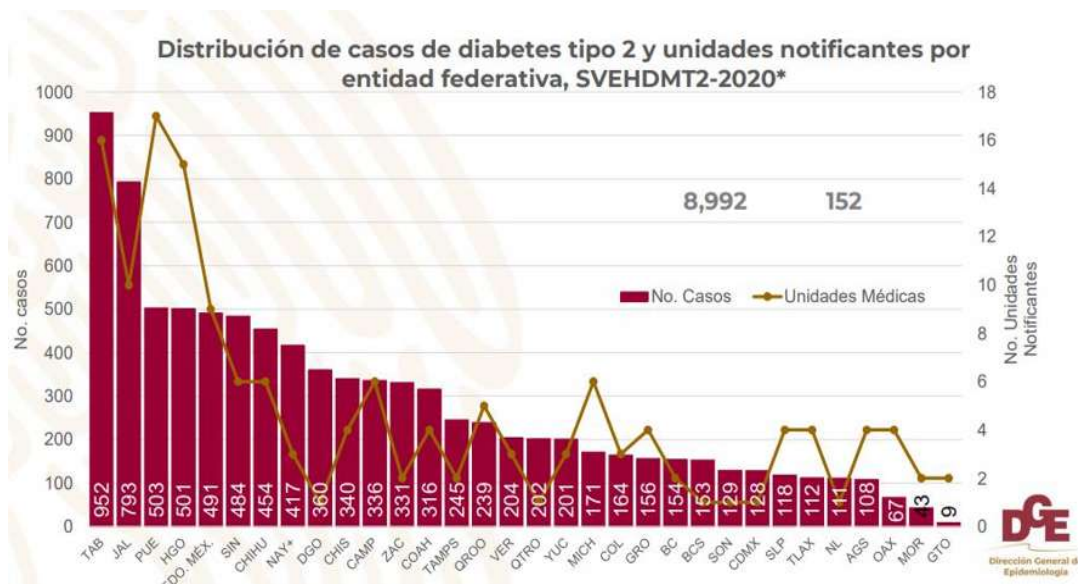


Fig. 2. Distribución de casos de diabetes tipo 2 y unidades notificantes por entidad federativa SVEHDMT2-2020. (DGE. 2020).

Con respecto a las revisiones de seguimiento y control realizadas a los casos de DM2, la toma de EGO fue la más frecuentemente realizada, seguida por la revisión de pies. En relación con la revisión oftalmológica y de nutrición se observa que en un 62.96% y 62.07% nunca se han realizado. (DGE. 2020).



Fig. 3 Proporción de revisiones en los casos de DM2, SVEHDMT2-2020.
(DGE. 2020)

Según la Organización Mundial de la Salud, otros 12 millones de personas son portadores de la enfermedad, aunque no lo saben, por la falta de cultura de detección temprana y habrán de desarrollarla para el 2030, para colocar al país en el noveno lugar, a nivel mundial. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia, son los países con mayor número de diabéticos. (Cluster salud. 2019).

China fue el país con un mayor número de enfermos de diabetes en 2019, llegando a superar los 116 millones de afectados. A este país le siguieron la India, con más de 77 millones, y Estados Unidos, con alrededor de 31 millones. Ahora bien, es preciso señalar que estos tres países son los más poblados del mundo. Se estima que la diabetes afecta al 9,3% de la población mundial. El número de personas que sufre de esta condición ha aumentado de manera continuada durante los últimos años, superando los 460 millones en 2019, casi 100 millones de personas más que en 2011. A cierre de 2045, se prevé que el número de personas con diabetes sobrepase los 700 millones. (Fernández. L. 2020).

1.1.3 Definición.

Se denomina DM al grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. (Hayes, J P. 2008).

1.1.4 Síntomas.

Los síntomas de la diabetes descompensada están claramente definidos:

1. Poliuria (Excreción muy abundante de orina).
2. Polidipsia (deseo excesivo por ingerir líquidos, especialmente agua)
3. Astenia (término médico de la fatiga. Se caracteriza por una debilidad generalizada del organismo)
4. Sensación de mucha hambre (polifagia)
5. Adelgazamiento inexplicado. (Hayes, J P. 2008).

1.1.5 Tipos de diabetes.

La clasificación es importante para determinar la terapia, pero algunas personas no se pueden clasificar claramente como diabetes tipo 1 o tipo 2 en el momento del diagnóstico. Los paradigmas tradicionales de La diabetes tipo 2 es que ocurren solo en adultos y la diabetes tipo 1 presente en niños y jóvenes, pero ambas enfermedades pueden ocurrir en ambos grupos de edad.

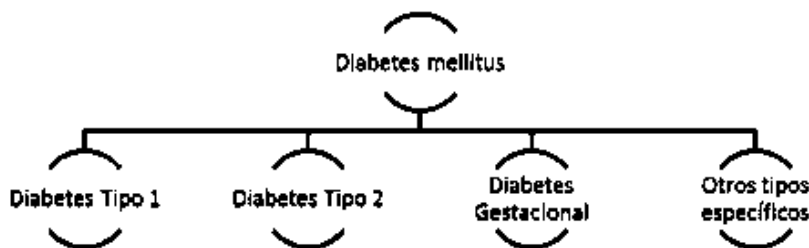


Figura 4. Clasificación de la diabetes mellitus.

(Velasco, B.J. et al 2014).

1.1.5.1.- Diabetes tipo I. (Insulino-dependiente).

El individuo presenta producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Generalmente se debe a una enfermedad autoinmune la cual causa destrucción de células beta en los islotes de Langerhans pancreáticos responsables de la producción de insulina e insulinopenia total. Existen distintas causas por las cuales puede ocurrir la destrucción de los islotes: virus, agentes químicos, autoinmunidad cruzada o, incluso, una predisposición génica. (Cervantes, R D, Presno, J M. et al 2013)., (Velasco, B.J. et al 2014)

Es más frecuente en la infancia, cuya incidencia está aumentando, especialmente en niños menores de 5 años, la cual presenta los síntomas característicos de poliuria / polidipsia, aproximadamente un tercio presenta cetoacidosis diabética. (Hayes, J P. 2008).

1.1.5.2.-Diabetes tipo II (Insulino no dependiente).

Los pacientes afectados por esta patología se vinculan principalmente a diversos factores como la obesidad, la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de diabetes, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria. Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos. Del 80 al 90% de las personas tienen células β sanas con capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina (obesidad, embarazo). Sin embargo, en el 10 al 20% de las personas se presenta una deficiencia de las células β en adaptarse, lo cual produce un agotamiento celular, con reducción en la liberación y almacenamiento de insulina, el exceso de peso en sí mismo causa algún grado de resistencia a la insulina. (Cervantes, R D, Presno, J M. et al 2013).

El musculo esquelético es el principal órgano blanco de la insulina, ya que allí se deposita por efecto de la insulina el 80% de la glucosa circulante; la llegada de los ácidos grasos bloquea las señales de la insulina, lo que lleva a una resistencia a la insulina en el tejido muscular esquelético (Castillo, Y, Riverón, G.2014). Se habla de resistencia periférica a la insulina a la que se produce en el músculo estriado, donde disminuye la captación y metabolismo de la glucosa; y de resistencia central a la insulina a la que se desarrolla en el hígado, donde aumenta la producción de glucosa determinando la hiperglicemia de ayuno. Lo anterior estimula la producción de insulina en las células beta, pero cuando éstas no pueden producir la cantidad de hormona suficiente para contrarrestar esta insulino-resistencia aparece la hiperglicemia. (López, G. 2009).

Modificables	No modificables
Sobrepeso y obesidad (central y total)	Raza
Sedentarismo	Historia familiar
Intolerancia a la glucosa (ITG) y glucosa alterada en ayunas (AGA)	Edad
Hipertensión arterial	Sexo
Colesterol de alta densidad (HDL-C) bajo	Historia de diabetes gestacional
Hipertrigliceridemia	Síndrome de ovarios poliquísticos
Factores dietéticos	
Ambiente uterino	
Inflamación	

Tabla 1. Factores de riesgo para la DM2. (Velasco B, et al 2014).

1.1.5.3.- Diabetes Gestacional.

Se diagnostica por primera vez durante el embarazo, generalmente durante el segundo trimestre. La placenta produce varias hormonas que se oponen al efecto de la insulina y producen un incremento en los niveles de glucosa. Factores de riesgo: Historia personal de diabetes gestacional. Se considera el predictor más agudo para DMG, aumentando el riesgo en un 33-50 % y si se suma un segundo factor de riesgo este aumenta aún más, historia familiar en primer grado de diabetes mellitus; La edad materna (> 25 años); Exceso de peso previo al embarazo (IMC > 25); Paridad (multigestante: mayor o igual a 3 hijos previos).

1.1.5.3.1 Complicaciones materno-fetales.

- **Malformaciones:**

Se presentan en los hijos de madres con diabetes preestablecida, que presentaron hiperglicemias en el período crítico de la organogénesis, 5 a 8 semanas después del último período menstrual. Niveles de HbA1c < 9 % se relacionan con abortos espontáneos en 12 % y malformaciones en 3 %; si los valores aumentan a más de 14 % la frecuencia de aborto espontáneo es 37 % y de malformaciones es 40 %. Si la HbA1c es < 7 % la probabilidad que se produzcan malformaciones mayores no llega a 2 %.

- **Muerte fetal intrauterina:** Ocurre más a menudo en las últimas 4 a 8 semanas del embarazo en pacientes con inadecuado control de la glicemia, (principalmente glicemia en ayunas > 105 mg/dl.

- **Macrosomía:** es la complicación más frecuente, definida como un peso por encima de 4000 gramos al nacer. Ocurre en un 20- 35 % de las diabéticas embarazadas.

Neonato hijo de madre diabética: El hijo de madre diabética en un futuro tendrá mayor incidencia de obesidad, intolerancia a la glucosa, diabetes en la adolescencia tardía y la adultez joven. (Campo, M, Posada, G.2008).

1.1.6 Complicaciones agudas.



Figura 5. Complicaciones agudas. (Guía de prácticas de las complicaciones agudas de la diabetes.2017).

1.1.6.1 Hipoglucemia.

Puede definirse como una concentración de glucosa en sangre venosa inferior a 60 mg/dl o capilar inferior a 50 mg/dl. Constituye la complicación más frecuentemente asociada al tratamiento farmacológico de la DM. Cualquier persona en tratamiento con hipoglucemiantes orales o insulina puede sufrirla, aunque ocurre con mayor frecuencia en pacientes que siguen tratamiento intensivo con insulina. Los síntomas y signos clínicos, de la hipoglucemia se dividen en (Mediavilla, J J. 2001).

Hipoglucemia leve.

El paciente percibe síntomas relacionados con la activación de los mecanismos adrenérgicos (ansiedad, inquietud, taquicardia, palpitaciones, temblores) o con los efectos de la hipoglucemia en el sistema nervioso (menor capacidad de concentración, mareo, hambre, visión borrosa).

Hipoglucemia moderada.

El estado neurológico del paciente presenta un deterioro evidente de la función motora, confusión o una conducta inadecuada pero el paciente continúa teniendo el grado de alerta suficiente para aplicar un auto tratamiento.

Hipoglucemia grave.

Es un episodio de hipoglucemia que da lugar a un coma, a crisis convulsivas o a un deterioro neurológico lo suficientemente importante como para que el paciente no sea capaz de aplicar un autotratamiento o necesite ser atendido por otra persona.

Complicaciones:

Las principales complicaciones de la hipoglucemia son: 1) El desencadenamiento de un síndrome de hiperglucemia (efecto Somogy). 2) Accidentes cardiovasculares agudos o cerebrovasculares. 3) Aparición de encefalopatía hipoglucemia o daño permanente en la corteza cerebral como consecuencia de episodios repetidos de hipoglucemias graves. (Mediavilla, J J. 2001).

1.1.6.2 Hiperglucemia.

En la diabetes mellitus, la hiperglucemia que causa complicaciones metabólicas agudas es resultante del déficit absoluto o relativo de insulina. Este déficit puede desembocar en que los pacientes diabéticos presenten un cuadro de cetoacidosis diabética o un síndrome hiperglucémico hiperosmolar, un tercio de los pacientes presentan una mezcla de las dos situaciones. (Mediavilla, J J. 2001).

1.1.6.2.1 Cetoacidosis diabética.

Es la complicación metabólica aguda propia de la diabetes mellitus tipo 1, aunque también la podemos encontrar en la diabetes tipo 2 en situaciones de estrés. Se produce como consecuencia de un déficit relativo o absoluto de insulina que cursa con hiperglucemia generalmente superior a 300 mg/dl. acidosis con pH inferior a 7,3 o bicarbonato sérico inferior a 15 meq/l. (Mediavilla, J J. 2001).

Los cuerpos cetónicos pueden aparecer en la orina (cetonuria) antes de que se muestre un aumento significativo de los mismos en la sangre. (Mediavilla, J J. 2001).

Esta patología suele ser secundaria a un déficit de los efectos de la insulina, lo que estimula la elevación de las hormonas contrarreguladoras como son el glucagón, las catecolaminas, el cortisol. Estas condiciones favorecen procesos catabólicos (proteólisis, glucogenólisis y lipólisis) liberando ácidos grasos libres en grandes cantidades, los cuáles son usados para producir energía, sin embargo, una parte considerable se metaboliza hacia cuerpos cetónicos, los cuáles se acumulan fácilmente. De esta manera, las proteínas y el glucógeno obtenidos se catabolizan hacia la obtención de glucosa, promoviendo un descontrol mayor. Este conjunto de alteraciones llevará al paciente a presentar deshidratación, acidosis metabólica, hiperglucemia. (Dañino, M C, Reyes D C, et al. 2017).

1.1.6.2.2 Estado Hiperosmolar Hiperglucémico.

Se caracteriza por alteraciones en el estado de conciencia, las cuáles son provocadas por una hiperglucemia significativa, acompañada de hiperosmolaridad y deshidratación grave, en donde puede aparecer o no, cetoacidosis, la cual suele ser leve. Dentro de la fisiopatología podemos observar que existe una producción suficiente de insulina para evitar la lipólisis, pero es ineficaz en la detención de la producción hepática y la utilización periférica de glucosa, generando hiperglucemia, con niveles mayores a los de una cetoacidosis diabética, esto propicia la aparición de la diuresis osmótica condicionando deshidratación con una pérdida de 8 a 12 litros aproximadamente, con una pérdida del 20-25% del peso corporal. Dentro de los criterios diagnósticos podemos encontrar: Niveles plasmáticos de glucosa > 600 mg/dl, pH arterial >7.3, Bicarbonato > 18 mEq/L. (Dañino, M C, Reyes D C, et al. 2017).

1.1.7 Complicaciones Crónicas.

Las complicaciones crónicas de la diabetes se clasifican en: a) macrovasculares (equivalente a arteriosclerosis), que son las que afectan a las arterias en general produciendo enfermedad cardíaca coronaria, cerebrovascular y vascular periférica; b) microvasculares, que incluiría la retinopatía, nefropatía y neuropatía, y c) el pie diabético, que aparecería como consecuencia de la neuropatía y/o de la afección vascular de origen macroangiopático. (Mediavilla, J J. 2001).

1.1.7.1 Retinopatía.

Para que se presente esta condición, existen factores de riesgo que son: Tiempo de evolución de Diabetes y control glucémico. Un mal apego al tratamiento e Hipertensión arterial y por último niveles elevados de lípidos en sangre La hiperglucemia daña de forma definitiva el endotelio ocular mediante: Un Incremento en la concentración de la glucosa intracelular, un aumento en el proceso de glicosilación no enzimática y un aumento del estrés oxidativo debido a la glicosilación y autooxidación de la glucosa. (Zenteno, I E, Daño, M C. et al. 2018).

1.1.7.2 Nefropatía diabética.

La clasificación más utilizada para la Nefropatía diabética es la de Mongensen.

Estadio 1 - Hiperfiltración y Renomegalia, estadio 2 - Lesiones glomerulares tempranas se presenta de dos a cinco años después del diagnóstico, estadio 3 - Se caracteriza por el inicio de la microalbuminuria, estadio 4 - Nefropatía clínica Aproximadamente un 30% a 40% de los pacientes llega a este estadio. Es caracterizado por proteinuria, severa hipertensión arterial, estadio 5 - Falla renal terminal Se presenta en 35% de los pacientes. (Serna, L M, Pineda, N, et al. 2009).

1.1.7.2.1 Fisiopatología.

Las primeras alteraciones encontradas en los pacientes con Nefropatía diabética son: 1) Microalbuminuria, 2) Hiperfiltración glomerular, lo que implica engrosamiento de la membrana basal glomerular, hipertrofia tubular. 3) Expansión de la matriz mesangial, posiblemente como mecanismo compensatorio para prevenir la pérdida urinaria de agua y electrolitos (Serna, L M, Pineda, N, et al. 2009).

1.1.7.3 Neuropatía diabética.

Las neuropatías diabéticas son un conjunto de trastornos nerviosos causados por la diabetes. Con el tiempo, las personas con diabetes pueden desarrollar daño de los nervios en todo el cuerpo. Algunas personas con daño nervioso no presentan

síntomas, mientras que otras pueden presentar síntomas tales como: Dolor, hormigueo o adormecimiento y pérdida de sensación en las manos, brazos, piernas y pies.

Los problemas de los nervios pueden presentarse en cualquier sistema de órganos, incluidos el tracto digestivo, el corazón y los órganos sexuales.

La neuropatía diabética se clasifica en periférica, autónoma, proximal o focal. Cada una afecta de varias maneras a diferentes partes del cuerpo.

- La neuropatía periférica, el tipo más común de neuropatía diabética, causa dolor o pérdida de sensación en los dedos del pie, en los pies, las piernas, las manos y los brazos.
- La neuropatía autónoma causa cambios en funciones digestivas, intestinales y vesicales, en la respuesta sexual y en la transpiración. También puede afectar los nervios asociados con el corazón y aquellos que controlan la presión arterial, así como los nervios en los pulmones y los ojos.
- La neuropatía proximal causa dolor en los muslos, caderas y produce debilidad en las piernas.
- La neuropatía focal ocasiona el debilitamiento repentino de un nervio o un grupo de nervios, causando debilidad muscular o dolor. Cualquier nervio en el cuerpo puede verse afectado.

(Neuropatías diabéticas: el daño de los nervios NHI.2019).

1.1.8. Estrés oxidativo.

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. (Viña, J, Vento, M. 1999).

1.1.9. Radicales libres.

Se considera radical libre (RL) o especie reactiva de oxígeno (ERO) aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad. En la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas: 1) O_2^- Anión súper óxido. 2) H_2O_2 Peróxido de Hidrógeno. 3) $OH\cdot$ radical hidróxido. 4) O_2 Oxígeno singulete. Un pro-radical libre Son sustancias que no siendo radicales libres, al contacto con otra especie química o por su alta inestabilidad química, tienen la posibilidad de convertirse o generar radicales libres (Gutiérrez, J. 2006).

El oxígeno, es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos sobre la función celular. (Mayor, R. 2010).

1.1.9.1. Fuentes de radicales libres *In vivo*.

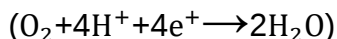
- Respiración mitocondrial que comprende la reducción coordinada mediante cuatro electrones del oxígeno a agua, siendo la donación de los electrones realizada por el NADH o succinato de los complejos I y II respectivamente de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Aparentemente, el sistema de transporte mitocondrial no es perfecto y se producen iones superóxido cuya dismutación enzimática conduce a la formación de hidroperóxido. (Viña, J, Vento, M. 1999).
- Oxidación peroximal de los ácidos grasos que genera hidroperóxido como subproducto.
- Enzimas Microsomales citocromo P450 encargados de metabolizar productos xenobióticos, generalmente de origen vegetal o medicamentos, reducen habitualmente el oxígeno a superóxido.
- Actividad de las células fagocitarias durante su ataque a gérmenes patógenos que produce una mezcla de oxidantes y radicales libres incluyendo superóxido, hidroperóxido, peroxinitritos e hipoclorito. (Viña, J, Vento, M. 1999).

También se producen radicales libres por la administración de paracetamol. Algunos agentes externos como son el humo de cigarrillos, radiaciones ionizantes y la luz solar. Una dieta hipercalórica, una dieta insuficiente en antioxidantes, Procesos inflamatorios y traumatismos y ejercicio extenuante son factores que también producen radicales libres. (Venéreo, J R. 2002).

En 1954 la Doctora Rebeca Gerschman sugirió por primera vez que las ERO eran agentes tóxicos y generadores de patologías, estableciendo tres postulados básicos: 1. Los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radicales ionizantes. 2. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes producían los efectos tóxicos. 3. La producción de RL es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis. (Mayor, R. 2010).

1.1.9.2 Radicales libres derivados del oxígeno.

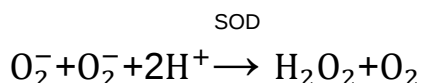
En la mayoría de las células aerobias, más del 90% del oxígeno consumido por ellas es reducido a agua por el mecanismo respiratorio mitocondrial, en cuya etapa final 4 electrones y 4 protones (iones hidrógeno) son transferidos casi simultáneamente a una molécula de oxígeno.



Pequeñas cantidades de oxígeno pueden ser metabolizadas por otras vías, de las cuales nos interesa señalar la reducción univalente o monovalente. En estos casos la molécula de oxígeno acepta un electrón por vez, dando origen a un grupo de compuestos intermediarios que constituyen los radicales libres derivados del oxígeno. (Korc, I, Bidegain, M, et al.1995).

1.1.9.3. Anión superóxido.

El superóxido se genera en la mayoría de las células aerobias por transferencia de un electrón al oxígeno molecular como producto colateral del transporte electrónico. Los macrófagos pueden generar superóxido durante los procesos inflamatorios por activación de la NADPH oxidasa de sus membranas plasmáticas, el que es utilizado para destruir determinadas cepas bacterianas. Algunas reacciones de auto oxidación como la de la hemoglobina, del citocromo P450, de las catecolaminas. La segunda etapa de la reducción univalente del oxígeno es la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede originarse a partir del superóxido en la reacción de dismutación catalizada por el superóxido dismutasa. Esta reacción permite la eliminación del superóxido con formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno. Señalado el (H_2O_2) no es un radical libre. Es, sin embargo, un oxidante tóxico para las células, cuya incubación con este compuesto puede lesionar el ADN, ocasionar la ruptura de membranas, o liberar iones calcio activando las enzimas proteolíticas dependientes de este ion. El (H_2O_2) atraviesa fácilmente las membranas y accede a toda la célula. Su toxicidad local depende de la presencia de enzimas tales como la catalasa y el glutatión Peroxidasa que lo destruyen. (Korc, I, Bidegain, M, et al.1995).

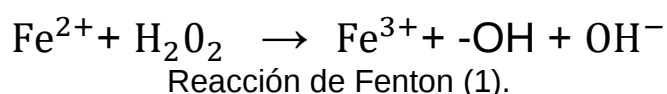


1.1.9.4 Radical hidroxilo.

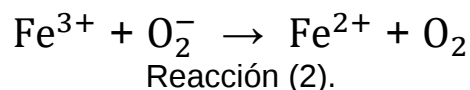
El radical hidroxilo ($OH^\bullet$), tiene una vida media muy corta (1 nanosegundo), lo que permite actuar únicamente en el lugar de su formación o en su proximidad. Cuando este radical se genera cerca de las membranas biológicas, puede atacar los ácidos grasos de los fosfolípidos que las constituyen, preferentemente los polinsaturados como por ejemplo el ácido araquidónico. Se constituye una reacción en cadena en

que un $\text{OH}^\bullet$ puede dar lugar a que cientos de moléculas de ácidos grasos se conviertan en lipohidroperóxidos cuya acumulación desorganiza la función de la membrana, pudiendo incluso llegar a destruirla. Además, los lipohidroperóxidos se pueden descomponer en una serie de productos citotóxicos, siendo los aldehídos los más perjudiciales.

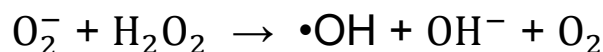
La formación del radical hidroxilo depende de una reacción catalizada por iones de metales de transición (hierro, cobre), siendo los iones hierro, aparentemente, los más probables promotores de las reacciones de los radicales libres. En la reacción de Fenton, el ion ferroso reacciona con el peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación del radical hidroxilo que es muy reactivo e interactúa rápidamente con el ADN, las proteínas y los Lípidos. (Korc, I, Bidegain, M, et al.1995).



El ion férrico reacciona con el superóxido como se indica.



En su conjunto las reacciones (1) y (2) son conocidas como reacción de Haber-Weiss. Siendo el resultado neto de ambas representado en:



Todas las reacciones que generan anión superóxido, debido a la reacción de dismutación también forman H_2O_2 . Habiendo flujo continuo de anión superóxido. Éste puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para generar el $\cdot\text{OH}$ que de este modo se iría formando durante el metabolismo oxidativo normal.

1.1.9.5 Especies reactivas del nitrógeno ERN.

El representante más sobresaliente de las ERN es el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), Este es sintetizado a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintasa en las células endoteliales, los neutrófilos, las neuronas y las microglías. A pesar de sus múltiples funciones fisiológicas (vasodilatación, prevención de la agregación plaquetaria, neurotransmisión etc.), el óxido nítrico es muy tóxico, dado que puede aumentar la toxicidad del superóxido al reaccionar con él. (Korc, I, et al. 1995).

Bajo ciertas condiciones el $\bullet$ NO puede ser convertido a otras ERN, tales como el catión nitrosonium (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), peroxinitrito (ONOO^-) y el dióxido de nitrógeno (NO_2). (Maldonado, O, et al. 2010).

1.1.10 Radicales libres y diabetes.

Diversos estudios muestran que el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes se ve alterado en los sujetos diabéticos, ya que se observa una disminución en la actividad de los antioxidantes y, por ende, el aumento de especies reactivas. Los radicales libres presentes en los sujetos diabéticos se asocian con la hiperglucemia crónica que caracteriza a esta enfermedad, pues ante un exceso de glucosa circulante se activan varias vías metabólicas no muy usuales en el organismo, lo que conduce a la generación de otros metabolitos, entre los cuales se encuentran radicales libres del oxígeno. En la hiperglucemia, la glucosa puede reaccionar con los grupos amino de las cadenas laterales de las proteínas para formar productos más estables como son los cuerpos de Amadori-glicación no enzimática de las proteínas séricas. Estos compuestos pueden reducir al oxígeno para formar inicialmente radical superóxido. Se ha vinculado a los radicales libres con los niveles bajos de insulina en los pacientes diabéticos, pues se ha demostrado que las células beta del páncreas no son inmunes al daño por los radicales libres. Así que, ya instalada la enfermedad, es posible que empeore la situación del sujeto diabético, dado que disminuye la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los radicales libres sobre el proceso normal de producción y secreción de insulina. Todas estas características de daño molecular pueden contribuir a las complicaciones del diabético. (Maldonado, O, et al. 2010).

1.1.11. Sistema de defensa antioxidante.

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que producen RL. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un RL. Las células cuentan con una serie de mecanismos que las protegen contra el estrés oxidativo.

RL involucrados:

- Superóxido (O_2^-).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$).

Las enzimas antioxidantes son la:

- Superóxido dismutasa (SOD). Cataliza la conversión enzimática del O_2^- en H_2O_2 a una velocidad muy superior de la conversión espontánea. Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: CuSOD y Zn-SOD: contienen cobre y cinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial.
- La catalasa (CAT). Elimina el H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos animales sobre todo en los Peroxisomas. Es específica del peróxido de hidrógeno. Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, Peroxisomas, citosol, eritrocitos.
- La glutatión Peroxidasa (GPX). Complementa la actividad de la catalasa en la metabolización del H_2O_2 , estando localizada predominantemente localizadas en el citoplasma. (Venéreo, J R. 2002 ; Korc, I, et al-. 1995).
- La Glutathione reductasa (GR): permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H_2O_2 . (Cisneros, E. 1995).
- La Glutathione transferasa (GST): su actividad primaria es la transferencia y unión de glutatión reducido a compuestos no polares que contienen un átomo de carbono, nitrógeno o azufre electrofílico. (Ortega, R. 2015).

1.1.11.1 Antioxidantes de tipo no enzimáticos.

El sistema de antioxidantes no enzimático está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los cuales intervienen al retrasar la producción y acción de los radicales libres. Dichos compuestos son un conjunto de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas que tienen como función; capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al RL con el objetivo de estabilizarlo. (Constanza, L y Muñoz, M, 2012).

Algunos antioxidantes no enzimáticos de las células son, los bioflavonoides, la vitamina E (alfa tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, los carotenoides, acetil-L- carnitina, selenio, vitamina B. Las vitaminas C y E, los carotenoides, el selenio, los flavonoides son las moléculas químicas antioxidantes más conocidas (Constanza, L y Muñoz, M, 2012).

1.1.11.2 Flavonoides.

Depuran compuestos de radicales libres (anión superóxido y el oxígeno singulete) así como iones de metales. Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas. (Martínez, S, et al. 2002). Son pigmentos amarillos naturales con propiedades antioxidantes potentes. Pertenecen al grupo de los metabolitos secundarios de las plantas. Las flavonas son un subgrupo de los flavonoides. Tienen propiedades y beneficios medicinales, sirviendo como complemento nutricional para proteger el organismo contra los radicales libres y la inflamación. (Flavonas 2017).

El valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción benéfica para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libre. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis. Sus propiedades anti radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilos y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de Peroxidación lipídica, y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y antiinflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma). (Martínez, S, et al. 2002).

1.1.11.3 Estructura química.

La estructura química básica de los flavonoides consiste en un esqueleto carbonado C6-C3-C6, donde los componentes C6 son anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que pueden formar o no un tercer anillo pirano o pirona (anillos A-C). Las distintas clases de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C (fig. 6), mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de estos grupos, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y B. (Álvarez, E, et al. 2002).

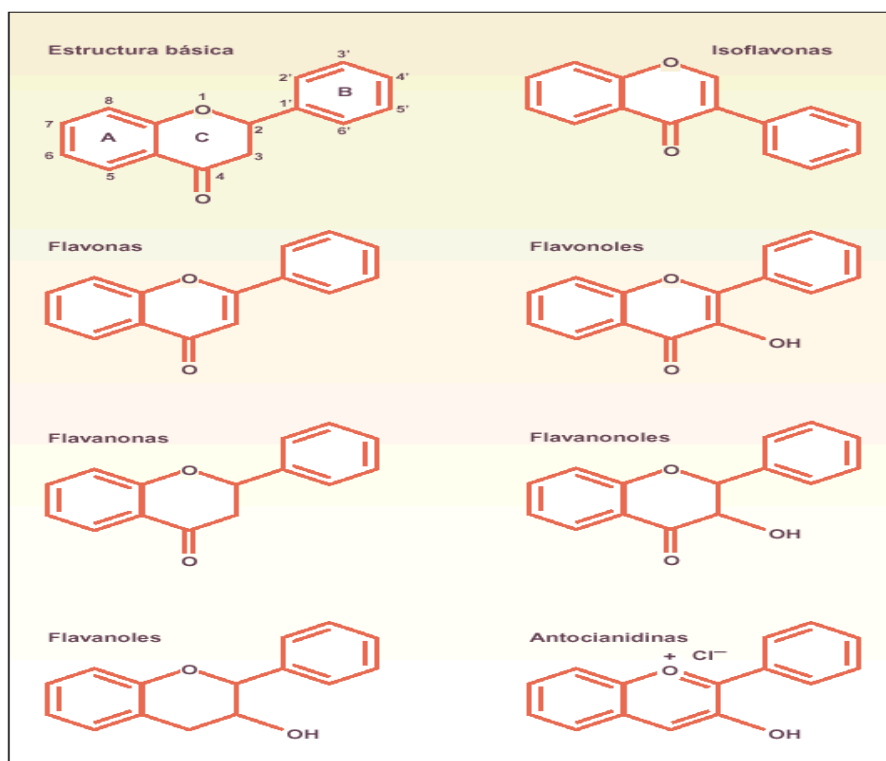


Figura 6. Estructura química de los flavonoides (Álvarez, E, et al. 2002).

La presencia de grupos hidroxilos aromáticos, que son relativamente reactivos, permite el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes y la posibilidad de formar complejos con iones metálicos como el cobre (Cu^{2+}) y el hierro (Fe^{2+}). Esto último limita la actividad de estos iones para interactuar con proteínas, para hacerlo con moléculas más simples tales como radicales o intervenir en reacciones de oxidación y reducción. (Álvarez, E, et al. 2002).

1.1.11.4 Propiedades de las flavonas para la salud humana.

- Protectoras del sistema cardiovascular.
- Neuro protectoras.
- Anticancerosas.
- Antiinflamatorias.

Hay evidencias que el consumo de flavonas puede proteger contra enfermedades cardiovasculares y neuropatológicas. Si bien los datos de los estudios están basados en experimentos con cultivos de neuronas in vitro, los resultados indican que las flavonas tienen propiedades antioxidantes neuronales, probándose en modelos de Parkinson e isquemia cerebral focal. Pero no hay estudios que profundicen con grupos de personas con estas patologías por lo que se desconoce si podrían tener los mismos beneficios que otros flavonoides como las isoflavonas y las antocianinas (Flavonas 2017).

1.1.11.5 Mecanismos antioxidantes de los flavonoides.

Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Martínez, S, et al. 2002).

Se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí. Casi todos los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. (Pérez, G. 2003).

1.1.11.6 Tipos y fuentes de flavonoides.

Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Se han identificado más de 5.000 flavonoides, entre los que se pueden destacar: 1. Citroflavonoides: quercetina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercetina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócolis, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno. 2. Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína. 3. Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino. 4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas. 5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras. 6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes. 7. Kaemferol: aparece en puerros, brócolis, rábano, y remolacha roja. (Martínez, S, et al. 2002).

Vitamina E: Está constituida por varios tipos de compuestos naturales, de los cuales el alfa tocoferol es la que posee la mayor actividad biológica (antioxidante y estabilidad de las membranas). Representa la principal defensa contra el daño oxidativo de la membrana en los tejidos humanos. Captura los radicales libres hidroxilos, neutraliza los peróxidos. (Álvarez, R. 2013).

Vitamina C: Es un antioxidante hidrosoluble con un alto poder reductor. Se encuentra a nivel intra y extracelular en la forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales superóxidos, hidroxilo, especies del nitrógeno en medios acuosos y algunos hidroperóxidos lipídicos. Algunos ejemplos por mencionar solo algunos están las acelgas, tomates (licopeno), todos los cítricos (limón, naranja, mandarina), además kiwi, fresa, guayaba. (Álvarez, 2013)., (Constanza, L, Muñoz, M, et al 2012), (Coronado, H, Salvador, M. 2015).

Los beta-carotenos o provitamina A: Son precursores metabólicos de la vitamina A. constituyen pigmentos de las plantas color amarillo, naranja y rojo y una vez ingeridos se transforman en el hígado y en el intestino delgado en vitamina A, se ha demostrado su papel en la prevención de las cataratas y en su efecto beneficioso en procesos inflamatorios y en los relacionados con el envejecimiento (Álvarez, R. 2013).

Licopeno: Es un antioxidante de la familia de los carotenoides, su pigmento es de color rojo. Supresor biológico del oxígeno singulete, despareado, para destruir a los radicales libres. (Álvarez, R. 2013).

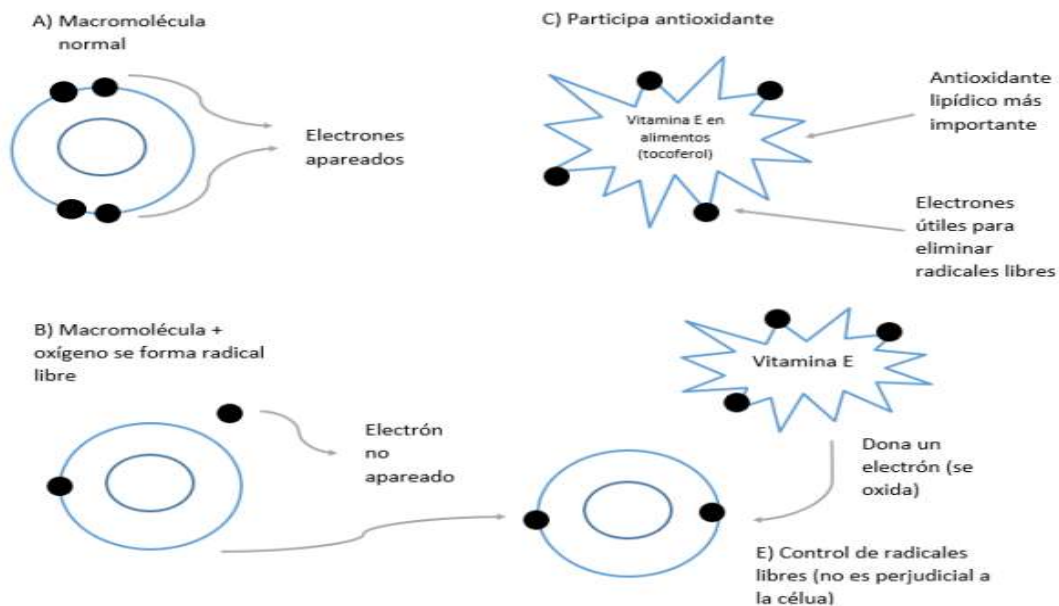


Figura 7. Interacción entre radicales libres y antioxidantes. (Coronado, H, Salvador, M. 2015).

1.1.12 Antioxidantes de tipo enzimático.

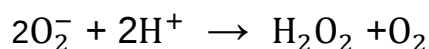
1.1.12.1 Superóxido dismutasa.

El radical anión superóxido O_2^- una de las primeras especies generadas por diversos sistemas celulares. Este radical es altamente tóxico por sí mismo, sobre todo porque daña a las proteínas que contienen centros Fe-S, sin embargo, también puede ser el generador de otras especies reactivas aún más tóxicas que él mismo.

La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima encargada de transformar esta especie reactiva en una de menor toxicidad. El descubrimiento de la actividad de la SOD fue reportado en 1969 por McCord y Fridovich, aunque la proteína ya había sido descubierta 30 años antes por Mann y Keilin, quienes reportaron el aislamiento y purificación a partir de muestras de sangre e hígado bovino de una proteína que contenía cobre y cuya actividad desconocían (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

1.1.12.2 La familia de las SOD.

Las SOD son una familia de enzimas que catalizan eficazmente la dismutación del O_2^- , como se observa en la siguiente reacción:



Esta familia está formada por tres miembros, los cuales se ubican en lugares claramente específicos, dos dentro de la célula y uno extracelular.

- I. La primera enzima es una SOD que tiene en su centro catalítico un cobre y un zinc (SOD1 o Cu/Zn-SOD) y se ubica en el citoplasma; el núcleo, en la membrana externa de la mitocondria.
- II. La segunda enzima está ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial. Ésta es una SOD que une manganeso en su centro catalítico (SOD2 o MnSOD).
- III. La tercera enzima, la cual se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular. Al igual que la primera SOD, ésta tiene asociado un cobre y un zinc (SOD3 o EC-SOD).

Si bien las tres realizan la misma actividad catalítica, guardan grandes diferencias en cuanto a su estructura y organización. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

SOD1.

La SOD1 o Cu/ZnSOD se encuentra en el citoplasma, núcleo, peroxisomas, y en la membrana externa mitocondrial. La enzima es un homodimero de 32KDa con Cu y un Zn por cada subunidad de 153 aminoácidos. Solo el cobre tiene importancia catalítica, mientras que el Zn confiere estabilidad a la estructura proteínica. El gen de la SOD1 se ubica en el humano en el cromosoma 21. Es inducida por estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, radiaciones ultravioletas (UV), metales pesados y por supuesto, el estrés oxidativo. El O_2^- puede dismutar espontáneamente a O_2 y H_2O_2 . El gen que codifica para la SOD1 se localiza en el locus 21q22.1. Las mutaciones descritas para este gen, pueden producir la disminución de la actividad de la enzima, dando lugar a la acumulación tóxica del O_2^- , como es el caso de la sustitución de un residuo de glicina por una alanina, en la posición 93 del gen que se cree que causa la disociación del Zn del sitio activo, reduciendo así la actividad catalítica de la enzima otros tipos de mutaciones se describe que la proteína gana en una función toxica, produciendo un exceso de peróxido de hidrógeno, con su posterior transformación al radical hidroxilo en presencia de iones ferroso. Las células que no expresan SOD1, no pueden eliminar eficientemente el O_2^- ; aunque este anión por sí mismo no es muy tóxico, puede reaccionar rápidamente con otros radicales y en presencia de metales dar lugar al radical hidroxilo (OH^-), especie reactiva altamente tóxica. (Castillo, Y, 2014).

SOD1 en la esclerosis lateral amiotrófica familiar. En esta enfermedad neurodegenerativa se afectan predominantemente las neuronas motoras de la corteza cerebral, de la médula y el tallo cerebral. Estas afectaciones provocan parálisis, depresión respiratoria y finalmente la muerte. Se considera que el gen SOD1, es uno de los más importantes en la patogénesis de este trastorno. Se reporta que las mutaciones en este gen son las responsables del 12-23 % de todos los casos. (Castillo, Y, 2014).

SOD2.

La mitocondria es, sin duda alguna, el organelo celular sometido a mayor estrés Oxidativo, puesto que se estima que alrededor de 4 a 5% de los electrones transportados por la cadena respiratoria son desviados para producir O_2^- . Por ello, resulta vital la presencia de la SOD2 dentro de la mitocondria. La SOD2 o MnSOD, aunque se localiza en la mitocondria, está codificada en el núcleo, por lo que su expresión está regulada, en gran parte, por el estado redox de la mitocondria. Lo anterior sugiere que existe una respuesta adaptativa al desequilibrio oxidativo

mitocondrial. El gen *sod2* está situado en el humano en el cromosoma 6. La enzima es un homotetrámero con un peso de 22kDa por subunidad, y posee un Mn^{+3} por monómero. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

SOD3.

Es la única proteína extracelular que puede eliminar el O_2^- . Es una proteína de casi 135 kDa y 2 aminoácidos que contenía un átomo de cobre y uno de Zn por subunidad. A diferencia de las otras SOD, la SOD3 presenta una glucosilación en la Asn 89. La SOD3 está presente en la matriz extracelular, principalmente unida a la heparina y a las fibras de colágeno tipo I de la mayor parte de los tejidos. También se ha encontrado en el plasma y en el fluido linfático y cefalorraquídeo; la concentración de SOD3 en la matriz extracelular es 20 veces superior a la presente en el plasma. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

La enzima puede dividirse estructuralmente en tres dominios funcionales:

1. La región amino terminal (residuos 1 a 95), la cual contiene el sitio de glucosilación, y contribuye a la solubilidad de la enzima.

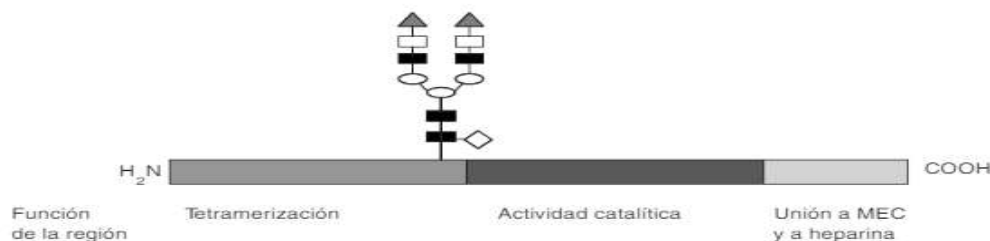


Figura 8. Relación estructura-función de la SOD 3. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

2. La región intermedia (residuos 96 a 193), que contiene al centro catalítico y exhibe una fuerte homología con la SOD1.
3. La región carboxilo terminal (residuos de 194 a 222), que contiene una secuencia de nueve aminoácidos con carga positiva (3 lisinas y 6 argininas) que le otorga afinidad por la heparina y el sulfato de hiparán, permitiéndole la localización

extracelular y en la matriz extracelular, este dominio se conoce como dominio carboxilo terminal de unión a heparina (DUH).

Existen tres fracciones, una que no tiene afinidad por la heparina (fracción A), otra con afinidad débil (fracción B) y una más con afinidad muy fuerte (fracción C). La mayor parte de la SOD3 que existe en los tejidos es del tipo C.

Nombre	Ubicación	Metal en centro catalítico	PES o KDa	Ubicación del gen en humanos	Características
SOD1, CuZnSOD	Citoplasma, núcleo, peroxisomas y en la membrana externa de la mitocondria	Cu y Zn	32	Cromosoma 21	Símero, 153 aminoácidos por unidad
SOD2, MnSOD	Membrana interna de la mitocondria	Mn	89	Cromosoma 6	Homotetrámero
SOD3, ECSOD	Extracelular, asociada a heparina, sangre, entre otros	Cu y Zn	135	Cromosoma 4	Glucoproteína tetamérica

Tabla 2. ubicación y características de la SOD. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

1.1.12.3 Reacción catalítica de las SOD.

El O_2^- generado en la mitocondria o en otros sistemas es convertido por las SOD. En H_2O_2 , el cual a su vez también es convertido en H_2O por la catalasa o por la Glutación Peroxidasa GPx.

La reacción enzimática ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), es llevada a cabo por la SOD. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

SOD y enfermedades genéticas Las mutaciones que pueden estar presentes en el gen SOD1, se han abordado fundamentalmente en el síndrome Down, donde el gen puede estar sobre expresado, y en la forma familiar de la esclerosis lateral amiotrófica familiar, donde varias mutaciones en el gen SOD1 son agravantes de la patogénesis de esta enfermedad. (Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007).

1.1.13. Glutación Peroxidasa.

La alteración de la actividad de la GPX provoca un aumento de los niveles de H_2O_2 y de lipoperóxidos, lo que puede ser fatal para la célula y aún más para el organismo, razón por la cual, esta alteración se encuentra implicada en un sin número de enfermedades y procesos fisiológicos. Glutación Peroxidasa (GPX) es un enzima que forma parte de un sistema antioxidante, la cual reacciona en forma efectiva contra lípidos y otros hidroperóxidos contribuyendo a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo. A nivel del cerebro humano la GPX es la enzima que da cuenta de la mayor parte de la actividad enzimática capaz de reducir H_2O_2 . (Cisneros, E, et al1997).

Existen al menos 3 formas de GPX seleno dependientes: una forma intracelular o celular (GPX-c), una extracelular o plasmática (GPx-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPX-PH) que por lo general está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, poseen diferencias estructurales. La GPx-c tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que por los L-OOH, en tanto la GPx-p tiene una afinidad semejante para los 2 sustratos. La GPX-c y la GPX-p utilizan como sustratos los H_2O_2 y los L-OOH; sin embargo, no son capaces de utilizar los fosfolipoperóxidos (PHL-OOH) que son los sustratos principales para la GPx-PH. (Cisneros, E. 1995).

La catalasa (CAT), al igual que la GPX, se encarga de eliminar el H_2O_2 y su localización celular es similar, pero sus mecanismos de regulación son diferentes. La GPX y la glutación reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPX/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPx. (Cisneros, E. 1995).

1.1.14. Glutación reductasa (GR).

La glutación reductasa (GR) es una flavoenzima dependiente de (NADPH) que cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) a glutación reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutación peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de lipoperóxidos (L-OOH), los cuales son elementos tóxicos. Esta se encuentra en todos los organismos aeróbicos. (Cisneros, E. 1995).

CARACTERISTICAS QUIMICOFISICAS.

La GR es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro (cis 90-cis 90'); cada subunidad contiene 478 aminoácidos, ambas subunidades presentan residuos esenciales que contribuyen a los sitios activos y de unión al glutación oxidado (GSSG). En su estructura presenta una extensión N-terminal flexible (residuos del 1-18) y 4 dominios estructurales bien definidos:

1. Dominio unido al (FAD) (residuos del 19-157).
2. Dominio de unión al NADPH (residuos del 158-293).
3. Dominio central (residuos del 294-364).
4. Dominio de interfase (residuos del 365-478). (Cisneros, E. 1995).

La GR contiene FAD y un disulfuro en su sitio activo. La reacción catalítica requiere de la reducción del sitio activo por el NADPH, produciendo una semiquinona del FAD, un radical sulfuro y un tiol. Después de la reducción del centro activo por el NADPH, el NADP puede ser liberado antes o después del paso catalítico que involucra al glutación. La GR permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H_2O_2 ; este GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol) luego de participar en la eliminación de radicales libres generados. El GSH interviene además en la detoxificación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la síntesis de los desoxirribonucleótidos, la función inmunológica y la proliferación celular. Por tanto, la alteración de la actividad de la GR provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno. La alteración de la actividad de la GR y de los niveles de GSH por esta consecuencia se ha reportado en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo. (Cisneros, E. 1995).

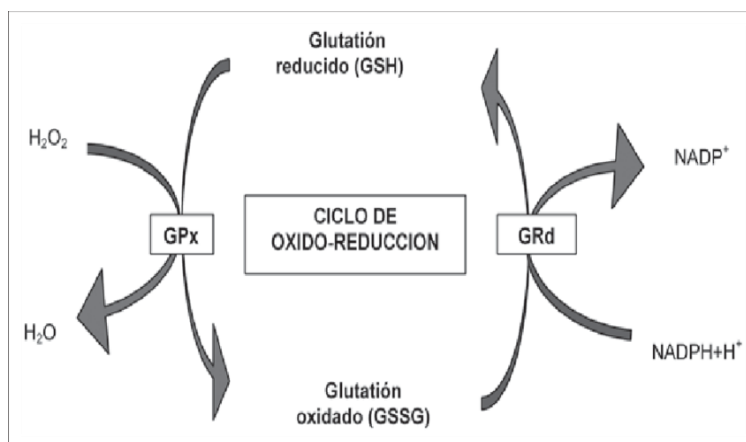


Figura 9. Ciclo de Oxido-Reducción. (Ciclo de óxido-reducción del glutatión. 2009).

1.1.15. Glutatión Reducido (GSH).

El glutatión (GSH) es un tripéptido que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral de glutamato. Es un antioxidante, y protege a las células de toxinas tales como los radicales libres. (Pérez G, 2008).

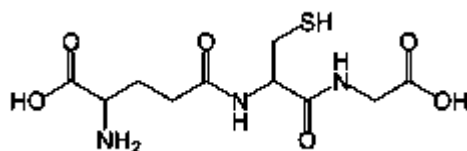


Figura 10. Fórmula estructural del glutatión (GSH).

(Pérez G, 2008).

El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que lo revierte a partir de su forma oxidada (GSSG), la glutatión reductasa, es constitutivamente activa e inducible bajo estrés oxidativo (Pérez G, 2008).

1.1.15.1 Biosíntesis del glutatión.

En la síntesis del GSH, inicialmente se unen el glutamato y la cisteína, para que al final se adicione la glicina mediante la intervención de la enzima gamma-glutamil-cisteína sintetasa (gamma-GCS) y la GSH sintetasa). Por otra parte, la gamma-glutamil-cisteína no convertida en GSH sigue una ruta alternativa, produciendo cisteína y 5-oxoprolina; esta última será convertida en glutamato vía la enzima 5-oxoprolinasa para evitar la pérdida de los aminoácidos. (Bonala, I.F, Irigonyen, M.E et al. 2014).

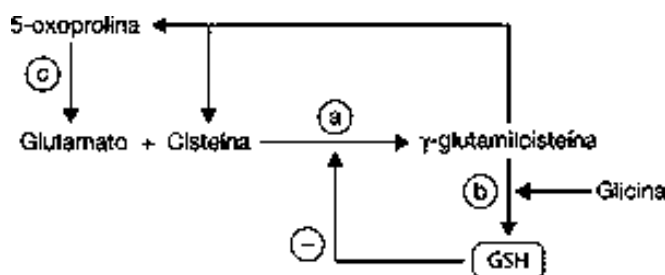


Figura 11. Síntesis del Glutatión. (Bonala, I.F, Irigonyen, M.E et al. 2014).

Aunque todas las células en el cuerpo humano son capaces de sintetizar glutatión, su síntesis en el hígado ha demostrado ser esencial (Pérez G, 2008).

1.1.15.2 Glutatión reducido y oxidado.

La glutatión reductasa es una flavoenzima dependiente de (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 peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de lipoperóxidos (L-OOH) (Cisneros, E. 1995).

El glutatión existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción a otras moléculas inestables. En la donación de un electrón, el glutatión mismo llega a ser reactivo, pero reacciona fácilmente con otro glutatión reactivo para formar disulfuro de glutatión (GSSG). En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG) (Pérez G, 2008). La forma reducida (GSH), entre el 80 al 85% se localiza en el citosol, del 10 al 15% en la mitocondria, y una pequeña parte en el retículo endoplásmico. (Bonala, I.F, Irigonyen, M.E et al. 2014).

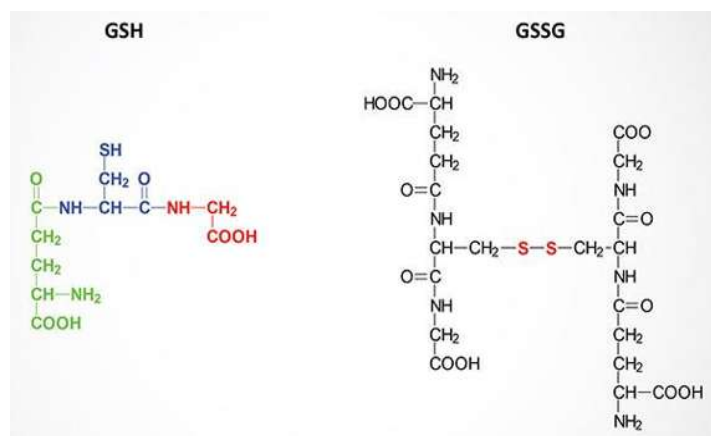


Figura 12. Glutati3n oxidado y reducido (Glutati3n reducido. 2018).

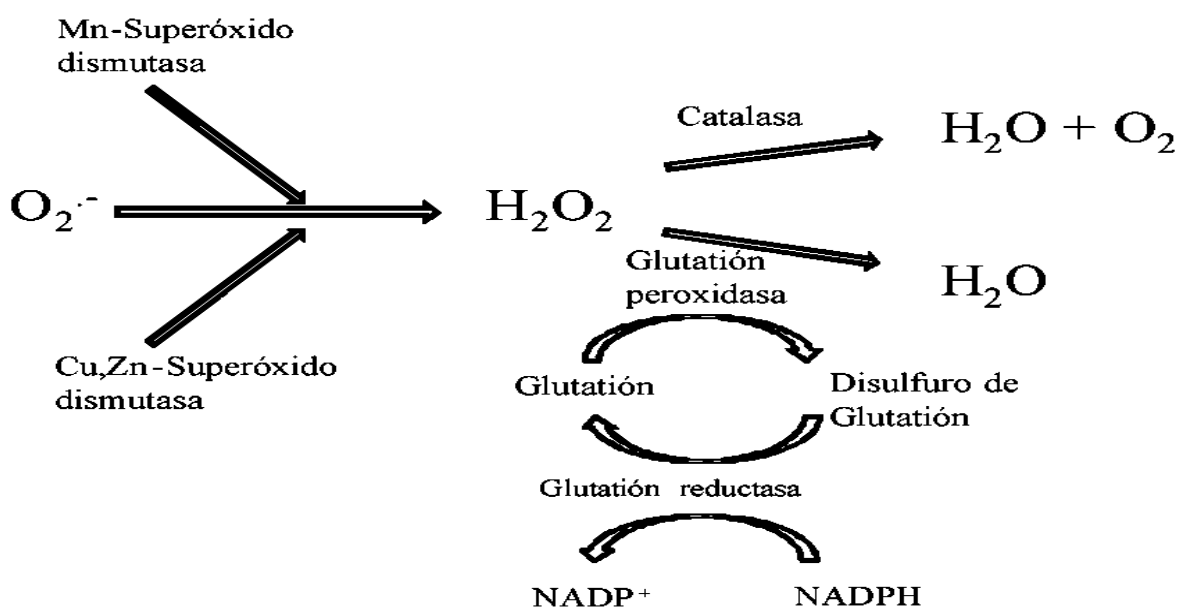


Figura 13. Esquema general de reducci3n del ani3n super3xido.

(Zuluaga, A, Gaviria, D.2012).

1.1.16. Glutathión S transferasa.

La glutathión transferasa (GST), antes conocidas por glutathión S-transferasas, son una súper familia de proteínas multifuncionales. Como su nombre indica, su actividad primaria es la transferencia y unión de glutathión reducido a compuestos no polares que contienen un átomo de carbono, nitrógeno o azufre electrofílico. Como consecuencia de esta función, contribuyen a la detoxificación o metabolismo de drogas, pesticidas, compuestos xenobióticos y otros productos que causan estrés oxidativo. También intervienen en procesos de detoxificación de agentes tóxicos de origen natural, como las toxinas de plantas y hongos filamentosos. (Ortega, R. 2015).

Las GSTs se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos. Esta súper familia se divide en 4 familias distintas, según su origen o localización celular:

- GSTs citosólicas.
- GSTs Mitocondriales (Se localizan principalmente en mitocondrias, pero hay evidencias de su presencia en Peroxisomas).
- GSTs Microsomales (están asociadas a membranas y en su mayoría, están involucradas en la síntesis de eicosanoides, leucotrinas y prostaglandinas, catalizando reacciones de transferencia de GSH).
- GSTs FosA (proteínas bacterianas de resistencia a fosfomicina). (confieren resistencia a fosfomicina. La fosfomicina es un antibiótico bactericida de amplio espectro y efectivo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, que actúa a nivel de la biosíntesis del peptidoglucano de la pared bacteriana. Existen tres mecanismos de resistencia a este antibiótico, uno de ellos está mediado por las enzimas GSTs FosA, que transfieren GSH a la fosfomicina, inactivándola). (Ortega, R. 2015).

1.1.17. Tratamiento para la diabetes mellitus.

El tratamiento de la diabetes mellitus está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y la prevención de complicaciones agudas y crónicas. Las estrategias de tratamiento se dividen en no farmacológicas como la dieta y el ejercicio y las farmacológicas que se dividen en medicamentos orales e insulina. La terapia con insulina tradicionalmente utilizada en la diabetes tipo 1 ha ampliado su uso recientemente con la indicación en la diabetes tipo 2 que puede utilizarse sola o combinada con medicamentos orales, con lo que pueden lograrse mejores metas de control y conseguir los objetivos deseados. (Santa, N.M, Zacarias, R. 2002).

Hay varios tipos de insulina disponibles. Cada uno comienza a funcionar a una velocidad diferente, lo que se conoce como “comienzo de la acción”, y ejercen su efecto durante tiempos diferentes, lo que se conoce como “duración del efecto”. La mayoría de las insulinas alcanza un pico, que es cuando tienen el efecto más fuerte, y luego este efecto se desvanece en el curso de algunas horas.

Acción	Insulina	Inicio de acción	Eficacia máxima	Efecto clínico
Ultrarrápida (análogos)	Lispro	15 min	40 min-1h	3-4 h
	Aspart	10 min	1-3 h	5 h
	Glulisina	5-10 min	5-10 min	5-6 h
Rápida	Cristalina	30 min-1 h	2-4 h	6-8 h
Intermedia	NPH	2-4 h	6-10 h	18-20 h
	PZI	3-4 h	6-12 h	18-20 h
Prolongada (análogos)	Glargina	1-2 h	No tiene pico de acción	24 h
	Detemir	1-2 h	No tiene pico de acción	20 h
	Ultralenta (degludec)	4-8 h	12-24 h	36-48 h

Tabla 3. Tipos de insulina y su acción. (Orlandi, N. et al. 2012, Pérez, A. et al. 2014, Díaz, O. et al. 2011, Costa, J.E. et al. 2014, Rivas, E. et al. 2012).

Diferentes formas de usar insulina	Imagen
Aguja y jeringa	
Auto inyector de insulina tipo bolígrafo	
Bomba	
Inhalador	
Inyector de insulina tipo jet	

Tabla 4. Diferentes formas de administrar insulina. (Insulina, medicamentos y otros tratamientos para la diabetes NHI. 2015).

1.1.17.1 Medicamentos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

La mayoría de las personas con diabetes tipo 2 comienza su tratamiento con Metformina en tabletas, aunque también viene en presentación líquida. La Metformina reduce la cantidad de glucosa que se produce en el hígado y le ayuda al cuerpo a utilizar mejor la insulina. (Insulina, medicamentos y otros tratamientos para la diabetes (NHI. 2015).

1.1.17.2 Aumentan la secreción de insulina independiente del nivel de glucosa.

Sulfonilureas:

Las sulfonilureas son ácidos débiles, que se unen ampliamente a proteínas, son metabolizadas en el hígado y excretadas a través del riñón o por las heces. Actúan aumentando la liberación de insulina a través de un canal de potasio ATP dependiente, pueden disminuir la resistencia periférica a la insulina. Las reacciones adversas más frecuentes son la hipoglucemia y el aumento de peso. Complicaciones hematológicas como trombocitopenia, agranulocitosis y anemia hemolítica han sido descritas con tolbutamida y cloropropamida. Las alteraciones gastrointestinales son poco comunes e incluyen dispepsia, náusea. La cloropropamida es la única que produce hiponatremia y retención de líquidos.

Droga	Vida media Horas	Efecto Horas	Dosis diaria	Dosis/día
Cloropropamida	24 - 48	24 - 72	100 - 500	1
Tolbutamida	3 - 28	6 - 10	500 - 3.000	2 - 3
Glipizida	1 - 5	14 - 16	2.5 - 20	1(-2)
Gliburide	2 - 4	20 - 24	2.5 - 20	1 - 2
Gliclazida	6 - 15	10 - 15	40 - 320	1 - 2
Glimepirida	24	-	8	1

Tabla 5. Propiedades farmacocinéticas de las sulfonilureas. (Santa, N.M, Zacarias, R. 2002).

Meglitinidas:

Actúan estimulando la secreción de insulina, por inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP de las células beta pancreáticas. Tiene una acción más rápida

y breve que las sulfonilureas. Se recomienda en el tratamiento de diabético no obeso.

Estimulan únicamente la secreción prandial de insulina (en presencia de alimento). La hipoglucemia es el principal efecto secundario descrito. (Ávila, L, 2010).

Compuesto	Nombre comercial	Presentación (mg/comp)	Dosis inicial (mg/día)	Máximo (mg/día)	Duración (horas)
Repaglinida	Novonorm Prandin	0.5 (90 comp) 1 (90 comp) 2 (90 comp)	0,5 -1,5	16 repartido en 3 tomas	4
Nateglinida	Starlix	60 (84 comp) 120 (84 comp) 180 (84 comp)	60-180	540 repartido en 3 tomas	4

Tabla 6. Meglitinidas y características. (Ávila, L, 2010).

1.1.17.3 Disminuyen la insulino-resistencia.

Biguanidas:

Son compuestos, los cuales tienen 2 moléculas de guanidina. Es el fármaco de elección en pacientes con sobrepeso u obesidad, no produce aumento de peso. En relación a los niveles de lípidos, la metformina reduce el nivel sérico de colesterol LDL, triglicéridos VLDL, Es el único antidiabético oral en el que se ha demostrado una reducción de las complicaciones macrovasculares a largo plazo. (Santa, N.M, Zacarias, R. 2002).

La metformina es un anti-hiperglucemiante oral de la familia de las biguanidas. Disminuye la glucemia en el diabético debido a un aumento de la captación y utilización de glucosa por el tejido muscular y adiposo en presencia de insulina. Reduce el sobrepeso del diabético obeso debido a que disminuye los niveles altos de insulina. Además, ejerce un efecto lipolítico y reduce la sensación de hambre (Metformina. EcuRed. 2011).

Actúa fundamentalmente en dos niveles: en el musculo y en el hígado. En el musculo aumenta la captación y utilización tisular de la glucosa, incrementando la sensibilidad a la insulina. En el hígado disminuye la producción de glucosa al reducir principalmente la neoglucogénesis y en menor medida, reduciendo la

glucogenólisis. La disminución de producción de glucosa por el hígado contribuye a la reducción de la glucemia en ayunas. La metformina carece de efectos directos sobre la célula beta pancreática y no influye en la secreción de insulina directamente, sino solo a través de sus acciones sobre las cifras de glucosa. (Tebar, (F.J, Escobar F. 2009) .

En menor grado, también aumenta la captación de glucosa en la célula muscular. Su efectividad es similar a la de las sulfonilureas (reducciones de HbA1c entre el 1,5 y el 2%), pero sin producir aumento de peso ni hipoglucemias y se asocia a una reducción de las cifras de presión arterial, triglicéridos, colesterol total y de las lipoproteínas de baja densidad, PAI-1 y otros marcadores de inflamación vascular. Se elimina por vía renal sin metabolizar. Tiene una acción reductora de los lípidos plasmáticos, principalmente de los triglicéridos. (Metformina. EcuRed. 2011).

Los efectos secundarios más comunes son a nivel gastrointestinal e incluyen anorexia, náusea, vómito, dolor abdominal, flatulencia y, muy especialmente, diarrea. Otros efectos, como el sabor metálico, son mucho menos frecuentes. El déficit de absorción de vitamina B12, observado en un 30% de los pacientes, raramente causa anemia perniciosa. El efecto adverso más grave, aunque muy poco frecuente, es la acidosis láctica, lo que ha conllevado su contraindicación en la insuficiencia renal o cardíaca y otras situaciones que predisponen a ella. (Mata, M. 2008). Esta sintomatología usualmente es transitoria y llega a presentarse al inicio del tratamiento. (Santa, N.M, Zacarias, R. 2002).

Tiazolidinedionas: Pioglitazona, Rosiglitazona.

Las tiazolidinedionas (también llamadas glitazonas o sensibilizadores de insulina), Actúan aumentando la sensibilidad a la insulina, sin afectar la secreción de la misma, específicamente se unen a los PPARs gamma, su mecanismo de acción es promover la captación de glucosa en músculo esquelético, tejido adiposo, y en el hígado a través de los receptores celulares nucleares conocidos como receptores gamma proliferador activado del peroxisoma. En el hígado las tiazolidinedionas aumentan la sensibilidad a la insulina, por lo tanto, disminuyen la producción hepática de glucosa. Disminuyen los triglicéridos, la insulinoresistencia marcada. Los efectos secundarios comunes incluyen sinusitis, infección del tracto respiratorio, faringitis, cefalea, ganancia de peso, retención de líquidos, anemia dilucional, usualmente no son severos. (Santa, N.M, Zacarias, R. 2002).

1.1.17.4 Disminuyen la excreción de glucosa.

Inhibidores de las alfas glucosidasas:

Acarbosa, Miglitol.

Estos fármacos, actúan inhibiendo la absorción de carbohidratos a nivel intestinal después de una comida, disminuyendo la hiperglucemia postprandial, Retrasan la entrada de glucosa a la circulación sistémica permitiendo ampliar el tiempo de la

célula beta para aumentar la secreción de insulina en respuesta al pico de glucosa plasmática.

Efectos secundarios frecuentes: Ganancia de peso (3– 4 kg), tienen mayor eficacia en pacientes con IMC ≥ 27 , anemia dilucional (efecto leve), flatulencia, distensión abdominal, meteorismo, cólicos abdominales, diarreas, mareo, elevación de enzimas hepáticas. (Santa, N.M, Zacarias, R. 2002).

1.1.17.5 Aumentan la secreción de insulina dependiente del nivel de glucosa y suprimen la secreción de glucagón.

Inhibidores de DPP4 (enzima dipeptidilpeptidasa IV): sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptin.

Mejoran la secreción de insulina y reducen los niveles de glucagón en pacientes con diabetes tipo 2, Su efecto sobre el peso corporal es neutro o favorable al bajar 2 a 3 kg, Inhibe la producción hepática de glucosa, disminución del vaciamiento gástrico, La inhibición de la DPP-IV causa una elevación de las concentraciones de GLP-1 tanto en individuos sanos como en pacientes con diabetes tipo 2, No se le conocen efectos indeseables hasta el momento, aunque se debe reducir dosis en la insuficiencia renal.(Reyes, F A, Pérez, M L, et al. 2016).

Agonistas del receptor de GLP1 (glucagon-like peptide 1):
exenatida, liraglutida.

Aumento de secreción pancreática de insulina en presencia de alimento, Inhibición de la liberación de glucagón y así de la producción hepática de glucosa. Disminuye la lipogénesis, la gluconeogénesis y glucogenolisis. Aumenta consumo de glucosa y síntesis glucógeno. Provoca una disminución de la ingesta de alimentos y da lugar a un incremento en la sensación de saciedad. Los efectos secundarios más importantes son: Nauseas, con menos frecuencia vómitos y diarreas. (Reyes, F A, Pérez, M L, et al. 2016).

1.1.17.6 Análogos de amilina:

Pramlintida.

Pramlintida es un análogo de la amilina que enlentece el vaciamiento gástrico, baja el glucagón durante la comida, y al ser un modulador central del apetito, regula la ingestión de alimentos. Se recomienda combinado con insulina en la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, lo que permite disminuir la dosis de insulina. (Reyes, F A, Pérez, M L, et al. 2016).

Medicamentos más utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo2.

Clase	Fármacos	Presentación Mg	Dosis de inicio mg	Dosis máxima mg
Sulfonilureas	Glibenclamida	5	2,5	20
	Glipizida	5	2,5	20
	Tolbutamida	500	500	3000
	Glisentida-Glipentida	5	2,5	20
	Glicazida(diamicron) Glizazida MR	80 30	80 30	320 120
	Glimepirida	1, 2, 4	1	8
Biguanidas	Metformin	500, 850, 1000	500, 850	2500
Meglitinidas	Repaglinida	0,5, 1 y 2	0,5 3v/día	4 3v/día
	Nateglinida	60, 120, 180	60 3v/día	120 3v/día
Glitazonas (Tiazolidindionas)	Rosiglitazona	2, 4, 8	2	8
	Pioglitazona	30	15	45
Inhibidores de las alfa glucocidasas	Acarbosa	50, 100	25 3v/día	100 3v/día
	Miglitol	50	25 3v/día	100 3v/día
Inhibidores de las DPP 4	Sitagliptina	25, 50, 100	100	100
	Vildagliptina	25, 50, 100	100	100

Tabla 7. Medicamentos más utilizados en la DM2. . (Rivas, E, et al.2012, Fernández, J, et al. 2012, Salavarría, N, et al. 2012).

Los medicamentos utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus, tienden a tener varios efectos secundarios adversos, los cuales, pueden ser, aumento de peso, mareos, anemias, colitis, diarreas. Además de que, por la alta demanda de medicamentos para esta enfermedad, el sistema de salud invierte un gran porcentaje de dinero para poder solventar a los pacientes que padecen dicha enfermedad.

Es por esto mismo que se buscan alternativas viables, que puedan apoyar a los tratamientos existentes o crear nuevas opciones para tratar dicha enfermedad. Los compuestos químicos que ofrecen diversas plantas medicinales, son una opción, además de seguir siendo utilizadas y en algunos casos preferidas entre las diversas clases sociales.

1.1.18. Acciones benéficas de los flavonoides para nuestro organismo.

Los flavonoides. Regulan la permeabilidad capilar, permiten el flujo de oxígeno, dióxido de carbono y otros nutrientes. Muchos flavonoides incrementan la fortaleza de los vasos capilares. Esto puede ayudar a proteger los vasos sanguíneos contra las infecciones y las enfermedades. Los flavonoides también pueden relajar el músculo liso del sistema cardiovascular, disminuyendo así la presión de la sangre. Esto también mejora la circulación en el propio corazón. Los flavonoides son antioxidantes y también pueden prevenir la oxidación del colesterol LDL, previniendo el aumento de placa arterioesclerótica. También pueden detener el agrupamiento de las plaquetas de sangre, reduciendo la coagulación de la sangre y el daño de los vasos sanguíneos. (Martínez, A. 2005).

II. Antecedentes

Las plantas han sido usadas como medicina alrededor del mundo, por milenios fueron la medicina original en todas las culturas y en las civilizaciones más grandes. La organización mundial de la salud (OMS), define a una planta medicinal como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. La estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos. (Cruz, D, López V.N. 2009).

Una administración adecuada de antioxidantes exógenos, permite a los pacientes diabéticos tener una mejor calidad de vida, pues las complicaciones micro y macro vasculares ocasionadas principalmente por la producción excesiva de radicales libres disminuyen con la administración de los antioxidantes. (Ramos M. et al .2006).

Más de 400 tratamientos naturales con plantas para la diabetes mellitus han sido registrados, pero solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia La utilización de extractos totales de las plantas ejerce en muchos de los casos un efecto más beneficioso sobre el organismo humano que la acción del compuesto aislado y produce menos efectos secundarios indeseables. La OMS ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos (Sánchez, L.A. 2000).

(Cochayuyo (*Durvillaea antarctica*)) Los antioxidantes que presenta ayudan a combatir los radicales libres, principales responsables del envejecimiento y la degeneración celular, debido a la gran cantidad de proteínas, fibra y vitaminas B y C. Además de ser rico en sales minerales, el Cochayuyo (*Durvillaea antarctica*) posee el selenio, zinc, yodo, manganeso y calcio, los que desarrollan una eficaz acción antioxidante en el organismo. (Sanchez C. 2007).

***Agrimonia eupatoria* L (Agrimonia)** Composición química de la planta: Aceite esencial, ácido silícico, ácido salicílico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido esteárico, ácido nicotínico, vitamina K, quercetina, taninos catequina (5%), compuestos triperterénicos (hojas) Las propiedades terapéuticas de la agrimonia reducen la hiperglucemia en ratones diabéticos. (Merzouki, A. et al. 2003).

Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*) La ingestión del extracto de Ginkgo biloba puede incrementar la función de las células beta pancreáticas tanto en sujetos con tolerancia normal a la glucosa como en pacientes con DM2. (Kudolo et al., 2006).

A. Schaffneri y A. Aculeaticarpa.

Se observa que existen diferencia significativa de la capacidad antioxidante entre las muestras, encontrando que el valor más elevado significativamente corresponde al extracto de etilo de la especie A. Schaffneri, seguido por el extracto de metanol de A. Aculeaticarpa. (Santander I.R. 2018).

2.2.2 Compuestos hipoglucemiantes y antioxidantes de plantas medicinales.

De manera general los principios activos contenidos en algunas plantas se clasifican de la siguiente manera:

los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C3. de acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, retinoides, etc.

Flavonoides. Tienen efectos en la salud, son antioxidantes y anti radicales. Protegen contra enfermedades cardiovasculares y cáncer. Previenen patologías como alergias y virus. (Cruz, D, López V.N. 2009).

2.2.3 *Cuphea procumbens*.

Nombre científico: *Cuphea procumbens*.

Nombres comunes: Calavera, hierba de la calavera, hierba del cáncer, nube azul, atlanchana, macachampa de milpa. (Graham, SA.1994).

Origen y distribución. México, siendo su distribución primariamente del Eje Neovolcánico (Jalisco, Michoacán, Guanajuato, México, Distrito Federal, Hidalgo, Puebla, Veracruz. (Graham, SA.1994).

Propiedades y usos. se ha usado en el tratamiento de diversos cánceres, tiene propiedades antiinflamatorias y propiedades analgésicas. (Hierbas y plantas medicinales. 2013).

Descripción. Planta de 20 a 60 cm de largo, débilmente erecta a decumbente, las ramas largas, extendidas, llevando setas glandulosas erectas, rojo-moradas, con peciolos hasta de 5 mm de largo. tallos generalmente postrados de color rojo oscuro o morado; hojas de uno a tres cm de largo y de 0.4 a 1.5 cm de ancho; flores moradas cubiertas con un tubo de color morado verdoso. Florece y fructifica de julio a diciembre, especialmente en septiembre y octubre. (Hierbas y plantas medicinales. 2013), (Arizaga, S, et al, 2018).



Figura 14. *Cuphea Procumbens*. (López, A. 2012).

En un análisis anterior de nuestro grupo de trabajo (Orozco Montes F.M y Fenton NB, 2018) se realizó el análisis de la concentración total de metabolitos secundarios que se desglosan a continuación.

Tabla 8. Concentración de polifenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de *Cuphea procumbens*.

Polifenoles		
Extracto	Tejido	mg de floroglucinol/ g de extracto
Acuoso	Hoja	126.07 ± 44.14 ^a
	Flor	189.80 ± 0.001 ^a
Acetónico	Hoja	20.37 ± 48.19
	Flor	20.11 ± 72.09
Alcohólico	Hoja	25.21 ± 88.29
	Flor	58.03 ± 71.1

Se muestra las medias y desviación estándar de los diferentes extractos utilizados (n=6). Se analizó utilizando una comparación múltiple entre los grupos mostrando significancia $p < 0.001$. (a) Indica los grupos con diferencia significativa de $p < 0.001$. Como se puede observar, el extracto acuoso de la flor contiene la mayor cantidad de polifenoles (189.90 ± 0.01), la menor cantidad fue observada en el extracto acetónico de la flor (20.37 ± 48.19).

TABLA 9. Concentración de flavonoides en extractos acuoso, acetónico y alcohólico de la hierba de la calavera.

Flavonoides		
Extracto	Tejido	mgQE/g tejido
Acuoso	Hoja	125.86 ± 0.05 ^a
	Flor	137.26 ± 0.04 ^a
Acetónico	Hoja	9.24 ± 0.01
	Flor	6.22 ± 0.004
Alcohólico	Hoja	26.51 ± 0.02
	Flor	19.35 ± 0.015

QE: Equivalentes de Quercetina.

Se muestra las medias y desviación estándar de los diferentes extractos utilizados (n=6). Se analizó utilizando comparación múltiple entre los grupos mostrando significancia $p < 0.001$. (a) Indica los grupos con diferencia significativa. Se observa al extracto acuoso de la flor con la mayor cantidad de flavonoides (137.26 ± 0.04). El valor más bajo se encontró en el extracto acetónico de la flor (6.22 ± 0.004).

Tabla 10. Concentración de fenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de la hierba de la calavera.

Fenoles		
Extracto	Tejido	mg GA/g tejido
Acuoso	Hoja	617.44 ± 33.44 ^a
	Flor	715.29 ± 33.16 ^a
Acetónico	Hoja	29.88 ± 6.05 ^b
	Flor	128.49 ± 10.85 ^c
Alcohólico	Hoja	139.28 ± 20.86 ^c
	Flor	259.23 ± 1.49 ^c

GA: Ácido gálico

Se muestran los resultados como media y desviación estándar, n=6. Se analizó utilizando comparación múltiple entre los grupos mostrando significancia $p < 0.005$. (a y b) muestra los grupos con diferencia significativa, (c) grupos con una $p > 0.05$. El extracto acuoso de la flor obtuvo la mayor cantidad de fenoles (715.29 ± 33.16), el extracto con menos concentración fue el acetónico de la hoja (29.88 ± 6.05).

La cantidad obtenida con la planta *Cuphea procumbens* de flavonoides y compuestos fenólicos es mayor a lo reportado para otras de la familia Lythraceae, para *Punica granatum* se reportó un máximo de 2.14 mgCE/g de extracto de flavonoides y de compuestos fenolicos un máximo de 19.35 mg GAE/g de extracto. (Shams Ardekani *et al.* 2011). Otra planta de la misma familia llamada *Cuphea aequipetala* se describió que sus hojas contenían un máximo de compuestos fenólicos de 55.62 mg GAE/g de extracto, en el caso de los flavonoides el contenido reportado fue de 193.83 µg QE/g de extracto (Martínez-Bonfil *et al.* 2013). (Orozco Montes F y Fenton NB, 2018).

III. Justificación.

México posee una de las mayores incidencias de diabetes mellitus, siendo el quinto país a nivel mundial con más casos de diabetes, teniendo una cifra de 12,056,7 millones de personas en 2017. El empleo de plantas medicinales está aumentando, tanto para mejorar el estado de salud general como para tratar enfermedades crónicas. Los pacientes, a menudo solicitan asesoramiento farmacéutico para el empleo de plantas medicinales en el tratamiento de DM2; sin embargo, no hay muchos estudios que ayuden a al personal del área de la salud a ofrecer consejos con fiabilidad. Los estudios existentes incluyen pocos pacientes y pocos datos sobre los efectos secundario y dosis que se necesitan para el uso en tratamientos en humanos. Por lo tanto, En las instituciones de salud, implican grandes pérdidas económicas debido a las constantes solicitudes de pacientes con DM. De ahí la importancia de buscar nuevas estrategias terapéuticas que puedan ayudar a contrarrestar los efectos crónico-degenerativos ocasionados por esta enfermedad. Se sugiere, por una parte, proponer a los profesionales de la salud la administración de antioxidantes como terapia alternativa, para contrarrestar el daño que ocasionan los radicales libres a las macromoléculas en aquellos pacientes que padecen alguna enfermedad crónico-degenerativa. Esto es con la finalidad de mejorar la calidad de vida de estos individuos o en su defecto para ayudar a prevenir y/o retardar la enfermedad.

El uso de EACP, puede ser una alternativa de apoyo, promoviendo que los enfermos con DM2 sigan sus esquemas de tratamiento hipoglucemiante y el extracto ser utilizado como un auxiliar para dicha enfermedad, además, que, por sus metabolitos secundarios, también podría a ayudar a bajar la cantidad de radicales libres generados por agentes externos, como el ambiente, el humo de tabaco y el estrés oxidativo que estas generan. Estudios previos han señalado que la planta *Cuphea procumbens* disminuye los efectos negativos de la diabetes tipo 2.

IV Hipótesis.

La administración del extracto acuoso de la hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*), modifica la actividad de las enzimas antioxidantes en modelos de ratas Wistar con diabetes mellitus tipo 2.

V. Objetivo general.

Evaluar las variaciones en las actividades de Superóxido dismutasa (SOD), Glutación Peroxidasa (GPX), Glutación S transferasa (GST), Glutación Reductasa (GR) en tejidos de ratas diabéticas posterior a la administración crónica de extractos de hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*).

5.5.1. Objetivos particulares.

- Evaluar las actividades de Superóxido dismutasa (SOD) en hígado, páncreas, riñón y corazón en diferentes tiempos de administración crónica.
- Evaluar las actividades de Glutación Peroxidasa (GPX) en hígado, páncreas, riñón y corazón en diferentes tiempos de administración crónica.
- Evaluar las actividades de Glutación S transferasa (GST) en hígado, páncreas, riñón y corazón en diferentes tiempos de administración crónica.
- Evaluar las actividades de Glutación Reductasa (GR) en hígado, páncreas, riñón y corazón en diferentes tiempos de administración crónica.

VI Materiales y métodos.

Material:

Reactivos con grado analítico.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (a partir de 120g). Los cuales se distribuyeron al azar en los siguientes grupos.

Grupo 1: Ratas sanas.

Grupo 2: Ratas diabéticas tratadas con metformina (6 UI/Kg).

Grupo 3: Ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de hierba de la calavera (EACP) (50 mg/Kg).

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 2011 del Consejo Nacional de Investigación, Washington, DC. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

6.6.1 Cuantificación de Concentración de Proteína.

Las concentraciones de proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford M 1976. Este método se basa en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del azul brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancias entre 465 y 595 nm. En el ensayo, se realizó una curva patrón utilizando BSA (Albumina Sérica Bovina 0-20 mg/mL), donde la concentración de las muestras problema se obtuvo al interpolar la absorbancia en la curva patrón, los resultados se reportaron en mg/ml.

6.6.2 Inducción de Diabetes.

La rata alimentada con fructosa (60%), es un modelo animal que muestra numerosas características de síndrome metabólico, entre las que destacan resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, así como hiperglucemia (Dupas y col., 2016). Los animales se consideraron diabéticos, si sus niveles de glucosa

sanguínea se encontraban por arriba de 100 mg/dL posteriores a la administración de fructosa. Estos valores fueron evaluados durante un periodo de 3 meses para asegurar que la enfermedad y sus alteraciones se encontraran presentes en los animales, siguiendo el método de Dupas y col, 2016.

6.6.3 Procedimiento para tratar los órganos.

El tratamiento crónico se realizó por 90 días en los tres grupos descritos anteriormente. Se realizó un muestreo los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 60 y 90 días. En estos tiempos se extrajeron los órganos más afectados, los cuales fueron, riñón, páncreas, corazón e hígado.

Los tejidos fueron homogeneizados utilizando un buffer como se describe posteriormente con cada enzima.

Posteriormente fueron centrifugados (3000 rpm/30min). El sobrenadante se tomó y fue separado para su posterior evaluación.

6.6.4 Cuantificación de enzimas.

6.6.4.1 Superóxido Dismutasa (SOD).

La actividad de SOD se evaluó espectrofotométricamente en base al método de Beyer 1987 y Moreno LS et al 2010, con el uso de EDTA (0.1 mM), NBT Cloruro azul de nitrotetrazolio (1.5 mM) Riboflavina 10 mM y SOD de 0,01-1 U/mL en Buffer fosfatos (0.067 M, pH: 7) donde se añadió el homogenado de los tejidos (10 µL). La mezcla se expuso a una luz fluorescente (40 watios durante 10 minutos). Se midieron los cambios a 560 nm. Las cuantificaciones se realizaron por duplicado. Para determinar la actividad de la SOD por unidad se usó la fórmula empleada por Moreno *et al.*, (2010):

$$UASOD = (V/v) - 1$$

Donde:

UASOD es la unidad de actividad de SOD, V y v representan la absorbancia en ausencia y presencia de SOD respectivamente.

Posteriormente para determinar la actividad enzimática específica (UAE_{SOD}) se utilizó la formula siguiente:

$$UAE_{SOD} = UASOD / \text{mg de proteína}$$

Esta unidad fue la que se utilizó para reportar el promedio y desviación estándar de las actividades de SOD evaluadas.

6.6.4.2 Glutación Peroxidasa (GPX).

La actividad de la Glutación peroxidasa se midió en la disminución de la absorbancia (Wang, Y, 1994), El principio de la técnica se basa en la oxidación del guayacol en presencia de H_2O_2 por la actividad de la peroxidasa dando como producto al

tetraguayacol y H_2O por lo tanto, se midió la disminución de la absorbancia de dicha oxidación. El sobrenadante del homogenado de la muestra problema se añadió al buffer de fosfatos (0.1M pH6.5) con guayacol 4M. En una celda de cuarzo Posteriormente se añadió H_2O_2 (1%) como sustrato. Y se registrar la disminución de absorbancia (470nm) a intervalos de 30 segundos por 3 minutos. Para calcular la actividad de la glutatión peroxidasa se utilizó la siguiente formula.

Unidades/mg= ($\Delta A/\text{min}$) (26.6 * mg de proteína).

Donde:

Unidades/mg= Actividad especifica por miligramo de proteína por mililitro

$\Delta A/\text{min}$ = Diferencia entre la absorbancia mayor y menor por minutos registrados.

26.6= Coeficiente de extinción del H_2O_2 .

Se reportó la actividad como U GPX/mg del promedio y desviación estándar de las actividades de GPX evaluadas (Chance, B & Maehly C, 1995; Wang, C.Y 1994).

6.6.4.3 Glutatión transferasa (GST).

La actividad de esta enzima se midió por el método establecido por Habig *et al.*, (1974). Se utilizó 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (100 mM). Buffer de fosfatos (0.1 M, pH: 6.5) y glutatión reducido Se incubaron 10 min a 30°C y posteriormente se añadieron 10 μL del homogenado de los tejidos. 1 mM. Se incubaron con La absorbancia se midió a 340 nm y se registró el aumento de la absorbancia durante 5 minutos a intervalos de 1 minuto.

Se reportó como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ del promedio y desviación estándar de las actividades de GST evaluadas.

6.6.4.4 Glutatión Reductasa (GR).

Se realizó la cuantificación de la actividad de la enzima glutatión reductasa GR cuantificando su producto el glutatión reducido (GSH) siguiendo el método descrito por Sedlak and Lindsay (1968).

Se utilizó Cloruro azul de nitrotetrazolio (NBT) (0.01 M), Tris buffer (0.2 M, pH 8.2), con 20 μL del sb del homogenado de tejido, con metanol absoluto. La mezcla fue agitada por 5 minutos en vortex a baja velocidad y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm a TA por 15 min. El sobrenadante se midió a 412 nm y GR se expresó como μmol GSH/mg proteína.

6.6.5 Análisis estadístico.

Se usaron las medidas de tendencia central: media y error estándar (E.E) así como un análisis de varianza (ANOVA) para establecer las diferencias entre los grupos... Se consideró una p significativa <0.05 . Se obtuvo una $P \leq 0.05$ se realizó un análisis post-hoc Tukey para determinar entre cuales grupos hubo diferencias. Se empleó el programa estadístico GraphPad Prism 6.0.

VII. Resultados.

A continuación, se describen los resultados obtenidos al realizar los análisis correspondientes a cada enzima. Iniciando con la Superóxido dismutasa (SOD) ya que es la que primero actúa.

7.7.1. Superóxido Dismutasa (SOD).

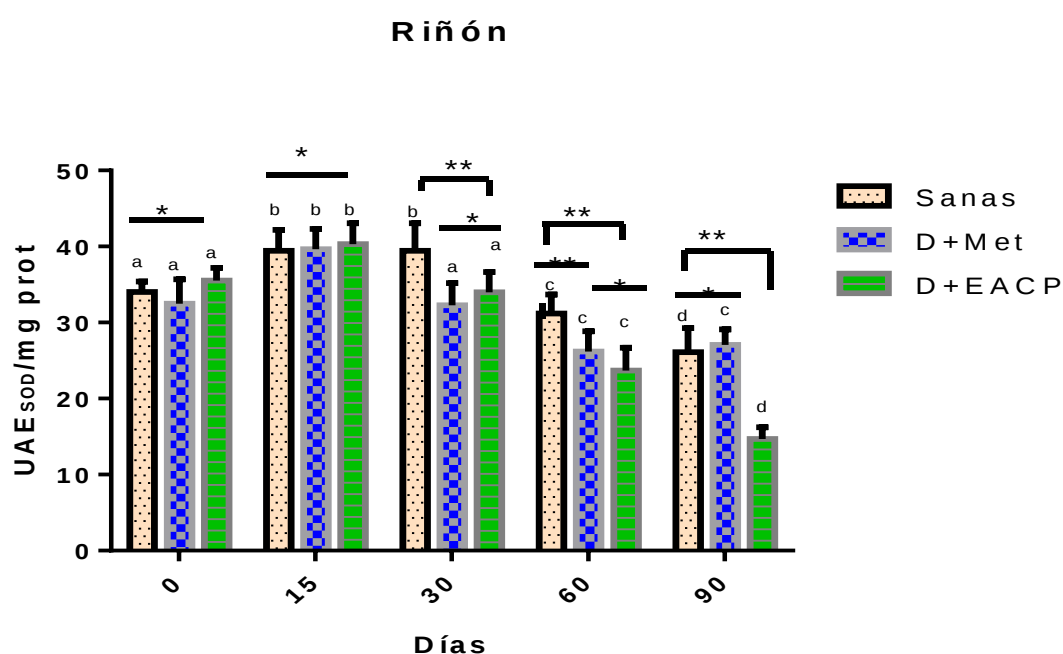


FIGURA 15. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en Riñón. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Para este grupo se observan cambios significativos ya que en el tiempo 15 hay un aumento en la actividad de la enzima con respecto al resto de los tiempos, puede ser que los modelos del grupo control se hayan mantenido estresadas. Conforme transcurre el tiempo de observación, esta actividad enzimática va disminuyendo, siendo más baja su actividad en el tiempo 90, que en el tiempo 0.

Grupo diabético con metformina: Comenzando en el tiempo 0, se puede observar una alta actividad enzimática, tomando en cuenta que dicho grupo ya presentaba Diabetes mellitus, manteniéndose constante hasta el tiempo 30. Se observa una disminución de la actividad de la enzima (SOD), en los tiempos 60 y 90, sin tener cambios significativos entre dichos tiempos.

Grupo diabético con EACP: En este grupo, se observa que la actividad enzimática de SOD, se encuentra ligeramente incrementada desde el inicio, para el tiempo 15 se ve un leve incremento. Conforme se va administrando el EACP, para el tiempo 90 se puede observar una gran disminución en la actividad de la enzima.

En el tiempo 0, el grupo sano se vio elevado en la actividad de la enzima SOD, sin tener ningún cambio significativo en comparación con el grupo diabético con metformina y el grupo diabético tratado EACP, representado por el (*), a pesar de que estos dos últimos ya presentaban diabetes mellitus. En el transcurso del tiempo en el que se fueron administrando los diferentes tratamientos, se puede observar que para el tiempo 90, nuestro grupo diabético con metformina, no posee cambios significativos con el grupo control, siendo así, el grupo diabético con EACP, el que tuvo una mayor disminución en la actividad de la enzima, siendo incluso más baja que el grupo con metformina.

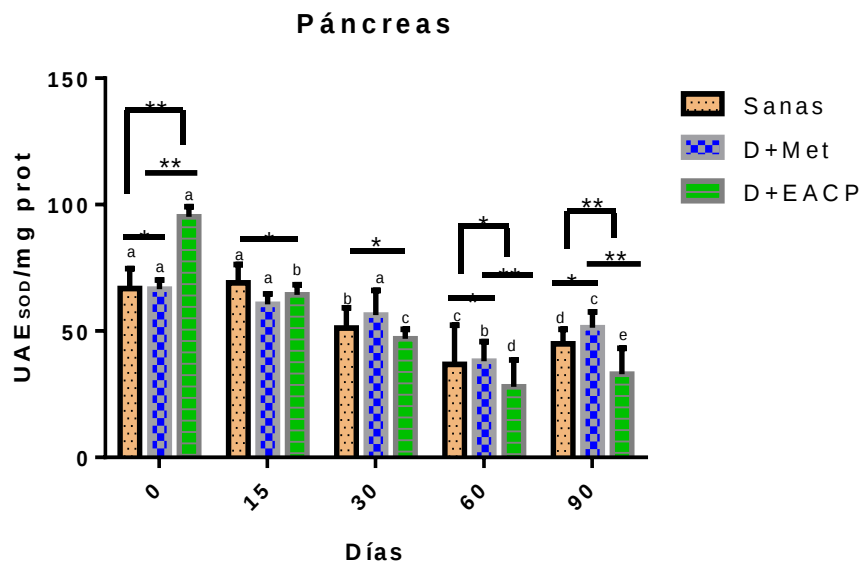


FIGURA 16. Superóxido Dismutasa (SOD) en Páncreas. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Del tiempo 0 al tiempo 15 se observa un aumento en la actividad de la enzima, sin que sean significativos, esto se puede deber a que nuestro grupo control permaneciera estresado durante dicho tiempo, la actividad de la enzima comienza a disminuir conforme pasa el tiempo de prueba, siendo la actividad de la enzima más baja en el tiempo 90 en comparación con el tiempo 0.

Grupo diabético con metformina: En este grupo se observa que la actividad enzimática comienza elevada y se mantiene constante hasta el tiempo 30. Observándose una disminución de esta enzima para el tiempo 60 y un pequeño incremento para el tiempo 90 siendo este último más bajo en comparación con los primeros 30 días de la administración del medicamento.

Grupo diabético con EACP: El grupo ya presenta diabetes mellitus, debido a esto y a la pronunciada hiperglucemia que poseen, nótese que no existen diferencias significativas con los otros grupos. Se observa un inicio con un mayor incremento en la actividad de la enzima. Conforme se va administrando el extracto, se va observando una disminución en la actividad de la enzima, siendo en el tiempo 60 donde se observa la mayor disminución en la actividad de la enzima. Para el tiempo

90, se observa un pequeño incremento en comparación con el tiempo 60, pero menor al tiempo 0.

En el tiempo 0, el grupo control no tiene cambios significativos con el grupo tratado con metformina, sin embargo, el grupo tratado con EACP es el más incrementado en la actividad enzimática. Para los tiempos 15 y 30, nuestros grupos no tuvieron cambios significativos entre sí. Para el tiempo 90, el grupo control no tuvo cambios significativos en comparación con el grupo tratado con metformina. El grupo tratado con el EACP, fue él que tuvo menor actividad de la enzima en comparación con los grupos anteriores. Observándose una disminución en la actividad de la enzima durante el tiempo que se fue administrando los distintos tratamientos.

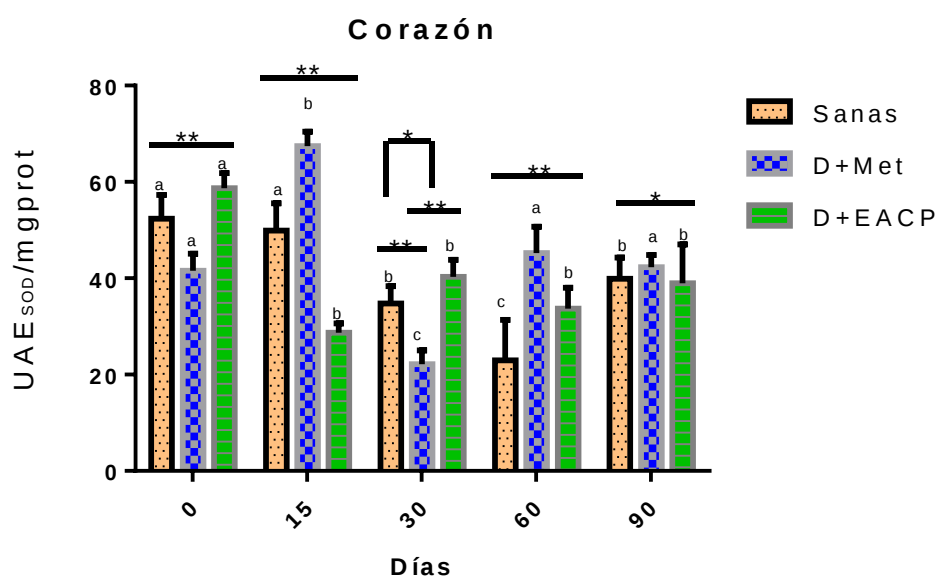


FIGURA 17. Superóxido Dismutasa (SOD) en Corazón. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Comenzando en el tiempo 0 al tiempo 15, se observa que no tuvieron cambios significativos, manteniéndose constante la alta actividad de la enzima, conforme paso el tiempo de prueba, fue disminuyendo la actividad enzimática.

Grupo diabético con metformina: Se observa que el tiempo 15, fue donde hubo la mayor actividad de la enzima, sin embargo, no hubo cambios significativos entre los

tiempos 0, 60 y 90, manteniéndose constante la actividad de la enzima durante la administración del tratamiento.

Grupo diabético con EACP: para el tiempo 0, comenzó con una alta actividad de la enzima SOD, recordando que, para este tiempo, el grupo ya tenía presente la diabetes mellitus. Nótese que el extracto reduce la actividad de esta enzima en el corazón desde el tiempo 15 días y se mantiene estable hasta el tiempo 90 días.

Comparando los grupos en el tiempo 0, se puede observar, que el grupo tratado con EACP fue el más elevado en comparación con los otros dos grupos. Pasando a los grupos en el tiempo 90, se observa que no hubo cambios significativos entre nuestros tres grupos, en donde también, se puede observar el efecto de la metformina y el EACP, notándose una disminución de la actividad de la enzima a lo largo de la administración crónica de ambos tratamientos.

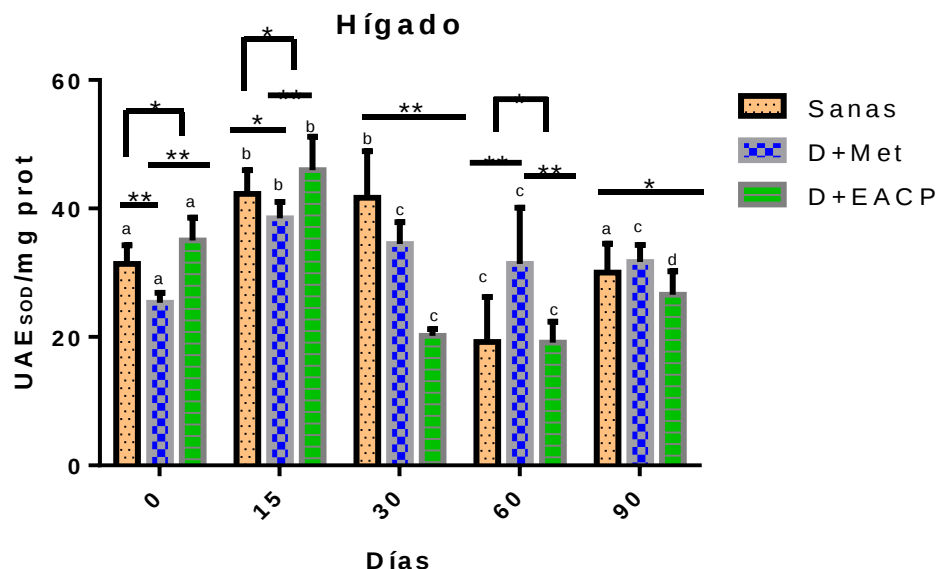


FIGURA 18. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en Hígado. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Para los tiempos 15 y 30 se observa un aumento que se mantiene constante en la actividad de la enzima SOD y en el estrés del grupo control en comparación con el resto de los tiempos, en el tiempo 90 se observa que no hay cambios significativos en comparación con el tiempo 0.

Grupo diabético con metformina: Para este grupo se observa un inicio con menor actividad de la enzima SOD, la cual, va incrementando para el tiempo 15, debido a que la enfermedad seguía desarrollándose, ya en los tiempos 30, 60 y 90 hubo un decremento en la actividad de la enzima, manteniéndose constante y sin tener algún cambio significativo.

Grupo diabético con EACP: En el tiempo 15 se observa un mayor incremento en la actividad de la enzima en comparación con el resto de las mediciones, para los tiempos 30 y 60, hubo un decremento en dicha actividad, además de mantenerse constante sin tener cambios significativos entre ellos, siguiendo al tiempo 90 se observa un ligero incremento en la actividad de la enzima.

Comparando los grupos en el tiempo 0, se puede observar que el grupo tratado con metformina fue el que tuvo una menor actividad de la enzima en comparación con

los otros dos grupos, el de mayor incremento en la actividad de la enzima fueron las tratadas con el EACP. Sin embargo, conforme se fueron administrando los distintos tratamientos, se observa en el tiempo 90 una disminución en la actividad de la enzima SOD, sin tener cambios significativos entre ellos.

7.7.2. Glutación Peroxidasa (GPX).

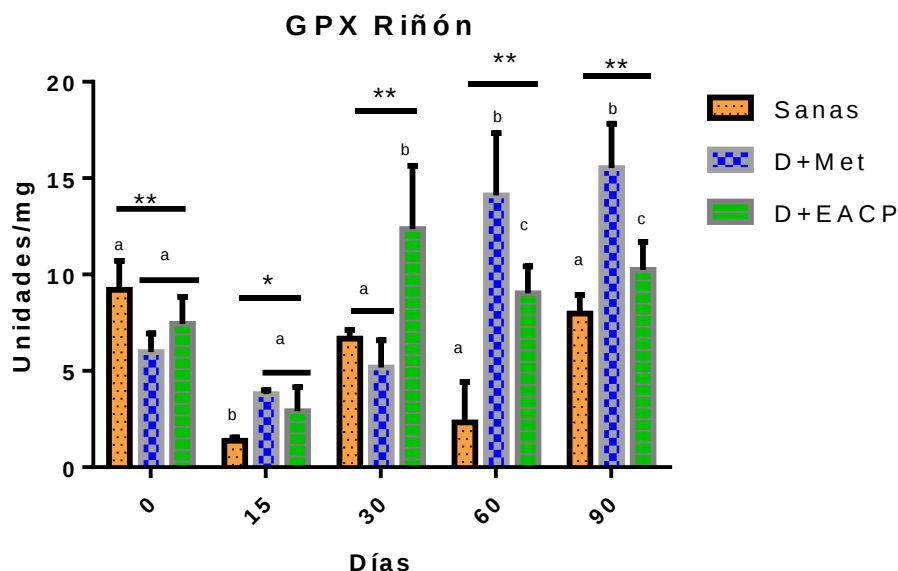


FIGURA 19. Glutación Peroxidasa (GPX) en Riñón. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Se obtuvieron en algunos casos desviaciones estándar muy altas, como fue en el caso del grupo tratado con metformina y el grupo tratado con EACP. Cabe hacer notar que estos dos grupos tenían el tratamiento con fructuosa por 4 semanas para que se desarrollara la diabetes, lo que generó un incremento en el estrés oxidativo.

Grupo control: se puede observar que se mantuvo constante la actividad de la enzima, en la cantidad de GPX formado, sin tener ningún cambio significativo durante los 90 días.

Grupo diabético con metformina: En este grupo se puede observar en el tiempo 15, una alta disminución de la actividad de la enzima en comparación con el resto de tiempos, sin embargo, durante el tiempo 30 hasta el tiempo 90, tuvo un incremento, manteniéndose constante sin tener ningún cambio significativo en la actividad de la enzima y su producto GPX. Se observa en la gráfica unas barras más altas que otras, sin embargo, estas no son estadísticamente significativas.

Grupo diabético con EACP: Para este grupo se puede observar una disminución en la actividad enzimática en el tiempo 15, en comparación con el resto. Para el tiempo 30 se incrementó y posteriormente se redujo en los tiempos 60 y 90 días.

En el tiempo 0, se puede observar que entre el grupo control y el grupo diabético con metformina, no presentaron diferencias entre su actividad enzimática, se observa un incremento en el grupo diabético con metformina, pero sin ser estadísticamente significativos. Para el resto de los tiempos se puede observar, que entre nuestros grupos no hubo diferencias entre la actividad enzimática, se observan ligeros incrementos entre los grupos, pero estos no son estadísticamente significativos.

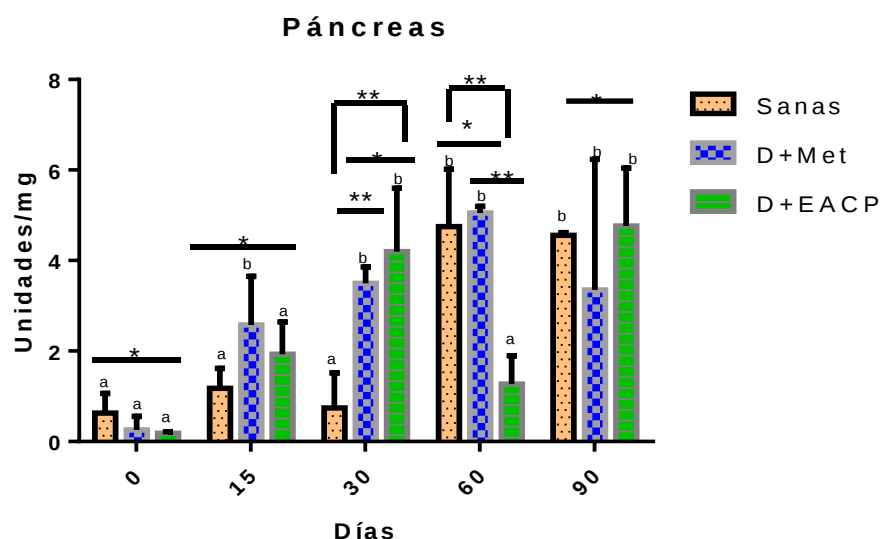


FIGURA 20. Glutación Peroxidasa (GPX) en Páncreas. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Las actividades al inicio fueron despreciables, se incrementaron significativamente en los tiempos 60 y 90 día, sin diferencias significativas.

Grupo diabéticos con metformina: Inició con valores cercanos al cero, de los días 15 a 90 se incrementó. Sin embargo, se observa un incremento en la actividad de la enzima en comparación con el tiempo 0, pero manteniéndose constante y estable sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con EACP: Comenzó el producto de la enzima cercano a cero, como los otros grupos. Posteriormente, se incrementó en los días 15 y 60, teniendo el mayor aumento en los días 30 y 90, sin presentar diferencias significativas con los otros grupos.

En los tiempos 0 y 15 no hubo diferencias significativas en el producto de la actividad de la enzima entre nuestros grupos, en el tiempo 90 los grupos no presentaron diferencias significativas.

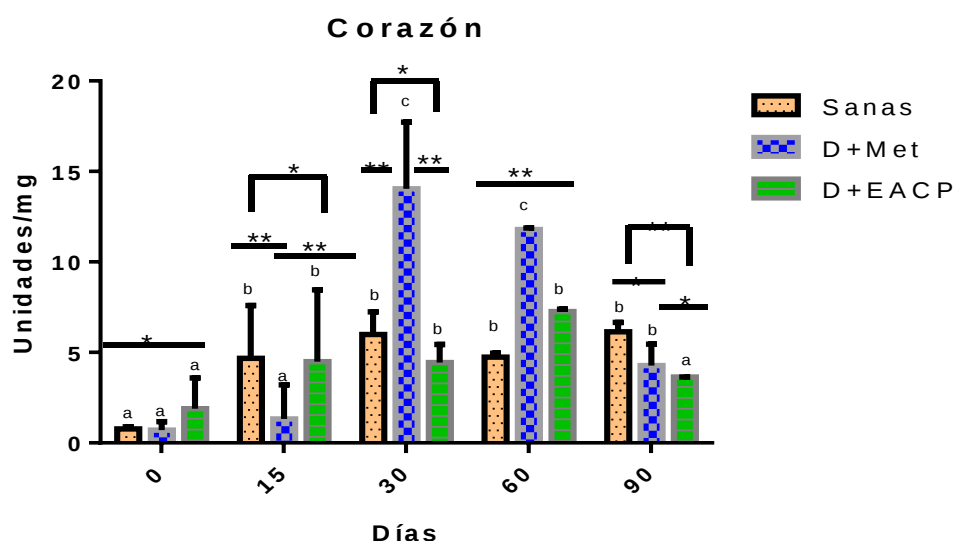


FIGURA 21. Glutatión Peroxidasa (GPX) en Corazón. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: La actividad de la enzima se vio incrementada a partir de los 15 días, la cual se mantuvo constante durante todo el estudio, sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con metformina: En el tiempo 30 al 60 se observa el mayor incremento en la actividad de la enzima, siendo significativo en comparación con los otros tiempos. Sin embargo, para el tiempo 90 hubo una disminución en la actividad

de la enzima, esto es debido a que la enfermedad seguía desarrollándose en el grupo.

Grupo diabético con EACP: En este grupo se puede observar un incremento en los tiempos 15, 30 y 60 días sin presentar diferencias significativas. Nótese que en el tiempo 90, los valores encontrados en este grupo fueron iguales a los del tiempo cero.

En nuestros tres grupos en el tiempo 0, no tuvieron diferencias significativas en la actividad de la enzima. Conforme se fueron administrando los diferentes tratamientos, se puede observar altibajos en la actividad de la enzima, sin embargo, ya para el tiempo 90, se demuestra el efecto que tiene tanto la metformina como el EACP, siendo así, que en ambos grupos no hubo diferencias significativas en la actividad de la enzima.

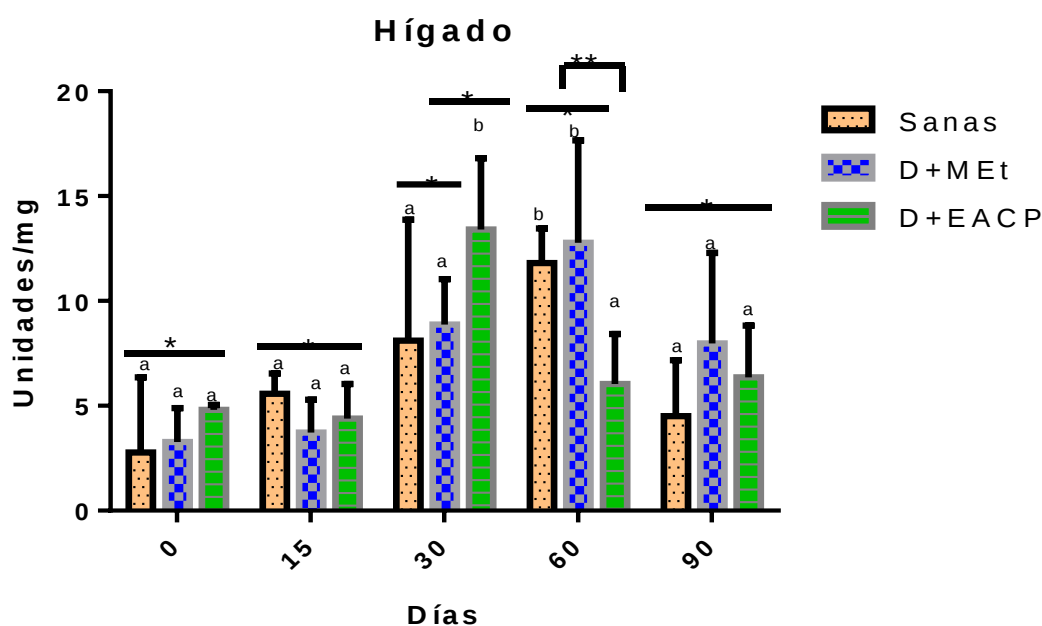


FIGURA 22. Glutación Peroxidasa (GPX) en Hígado. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Se obtuvieron en algunos casos desviaciones estándar muy altas, los grupos que presentan dicha desviación, fueron tratados con fructuosa por 4 semanas para que se instalara la diabetes, lo que generó un incremento en el estrés.

Grupo control: se puede observar que en el tiempo 60, fue donde tuvo una mayor actividad de la enzima, sin embargo, para el resto de los tiempos, se mantuvo estable y constante la actividad enzimática, sin tener cambios significativos entre el tiempo 0 y el tiempo 90.

Grupo diabético con metformina: En el caso de este grupo, se observa una mayor actividad de la enzima para el tiempo 60. Para el resto de nuestros tiempos, se observa que la actividad de la enzima se mantiene estable y constante, siendo así que para el tiempo 0 y el tiempo 90 se mantienen sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con EACP: Para este grupo, se observa, que para el tiempo 30, tuvo el mayor incremento en la actividad de la enzima, para el resto de los tiempos, se mantuvo estable y constante la actividad de la enzima, siendo así que en el tiempo 0 y el tiempo 90 se mantuvo sin tener cambios significativos.

En nuestros tres grupos en el tiempo 0, no tuvieron diferencias significativas en la actividad de la enzima, lo mismo sucede en los tiempos 15 y 90, para el final del tratamiento, se observa que, en ambos tratamientos, estuvieron a la par en la actividad de la enzima, sin tener diferencias significativas entre los tres.

7.7.3. Glutación Transferasa (GST).

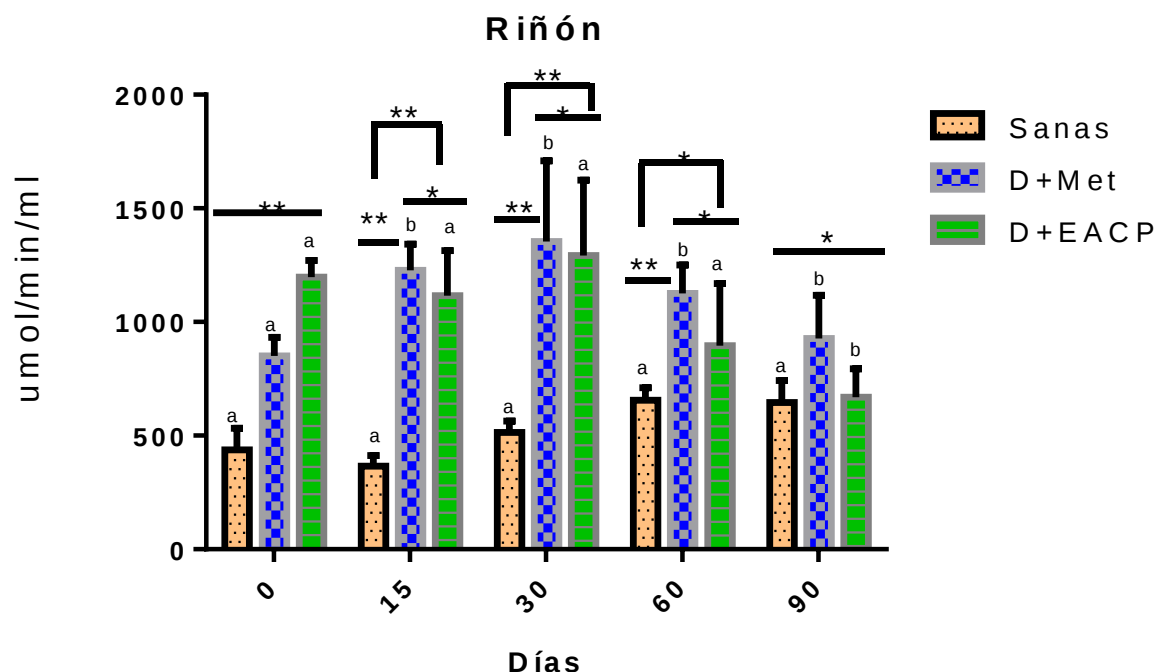


FIGURA 23. Glutación Transferasa (GST) en Riñón. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: La actividad de la enzima se mantuvo constante (nótese la misma letra a lo largo de los tratamientos) y estable durante los 90 días de observación.

Grupo diabético con metformina: En este grupo, la actividad de la enzima comenzó un poco baja, sin embargo, desde el tiempo 15, se observa un leve incremento en la actividad enzimática, la cual se mantiene constante y estable hasta el final del tratamiento.

Grupo diabético tratado con EACP: En este grupo, comenzó elevada la actividad de la enzima, sin embargo, se mantuvo estable y constante hasta los 60 días de tratamiento, por el efecto del EACP, ya para el tiempo 90, esta actividad enzimática disminuyó.

Se puede observar que en el tiempo 0, el grupo tratado con EACP, fue el que tuvo la mayor actividad enzimática, en comparación con el grupo tratado con metformina y el grupo control. Conforme se fueron administrando los tratamientos crónicos durante los 90 días, nuestro grupo con EACP no tiene diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con metformina y el grupo control.

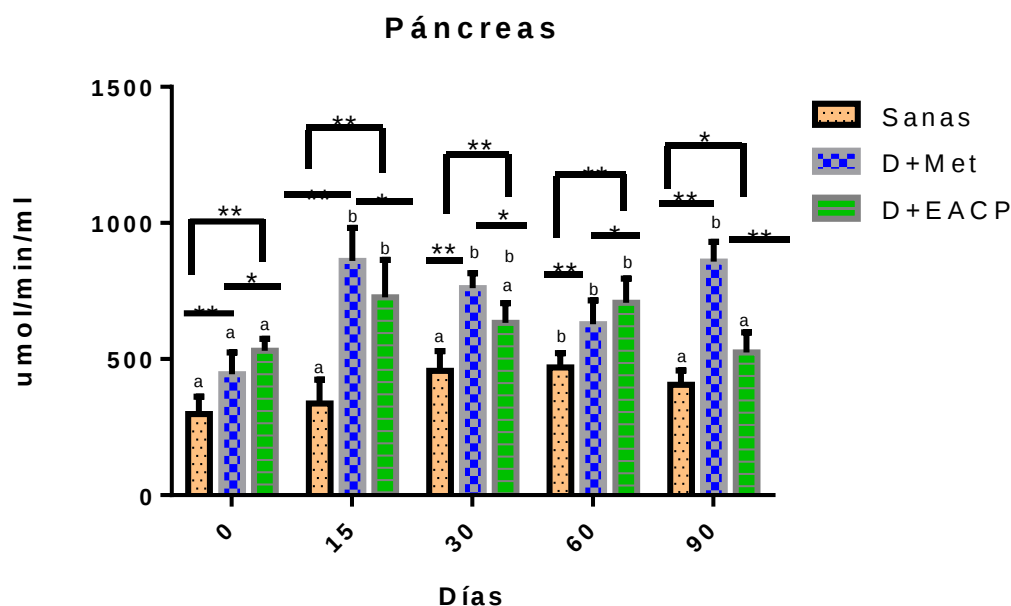


FIGURA 24. Glutathión Transferasa (GST) en Páncreas. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Para el tiempo 60, se puede observar un pequeño incremento en la actividad enzimática, para el resto de los tiempos, se mantuvieron constantes y estables en la actividad de la enzima sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con metformina: En el tiempo 0, se observa una baja actividad de la enzima en comparación con el resto de los tiempos, los cuales desde el tiempo 15 hasta el final del tratamiento, se mantiene estable y constante la actividad de la enzima, sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con EACP: En el tiempo 15 al tiempo 60, se observa un leve incremento en la actividad de la enzima, sin embargo, se mantiene estable y constante en dichos tiempos, sin tener cambios significativos entre ellos. Sin embargo, en el tiempo 90 se observa una disminución en la actividad de la enzima, sin tener cambios significativos en comparación con el tiempo 0.

Comparando nuestros tres grupos en el tiempo 0, se observa que tanto el grupo con metformina como el grupo con EACP, no tienen diferencias significativas en la actividad de la enzima, el grupo control es el que presenta la menor actividad de la enzima en dicho tiempo. Conforme se fueron administrando los tratamientos, se observa que en el tiempo 90, tanto el grupo control como el grupo con EACP, no tuvieron diferencias significativas, teniendo la mayor actividad enzimática el grupo tratado con metformina.

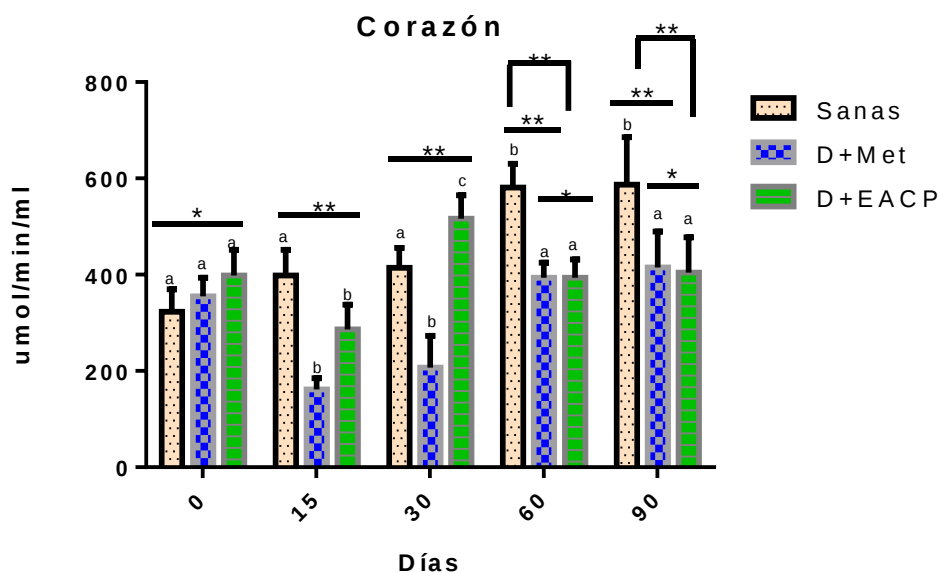


FIGURA 25. Glutathión Transferasa (GST) en Corazón. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Para este grupo se puede observar que para los primeros 30 días de observación, se mantuvo estable y constante la actividad de la enzima, sin embargo, ya para el tiempo 60 y 90 se observa un incremento en la actividad de la enzima, la cual, de igual forma se mantiene constante, sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con metformina: Para el tiempo 15 y 30, se observa la mayor disminución en la actividad de la enzima. Para los tiempos 60 y 90, tuvo un leve incremento en la actividad enzimática, sin embargo, se mantuvo estable y sin tener cambios significativos en comparación con el tiempo 0.

Grupo diabético con EACP: En el tiempo 15, fue donde se observa la menor actividad de la enzima, para el tiempo 30, se observa la mayor actividad de la enzima en comparación con el resto de los tiempos. Para los tiempos 60 y 90, demostraron un decremento en la actividad de la enzima, sin tener cambios significativos entre dichos tiempos y sin tener cambios significativos con el tiempo 0.

Nuestros tres grupos en el tiempo 0, comenzaron sin tener diferencias significativas entre ellos, conforme se fueron administrando los diferentes tratamientos crónicos, se observa que transcurridos los 90 días de observación, nuestro grupo tratado con metformina no tiene diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con EACP, solamente el grupo control presenta una elevada actividad de la enzima, en comparación con los anteriores grupos.

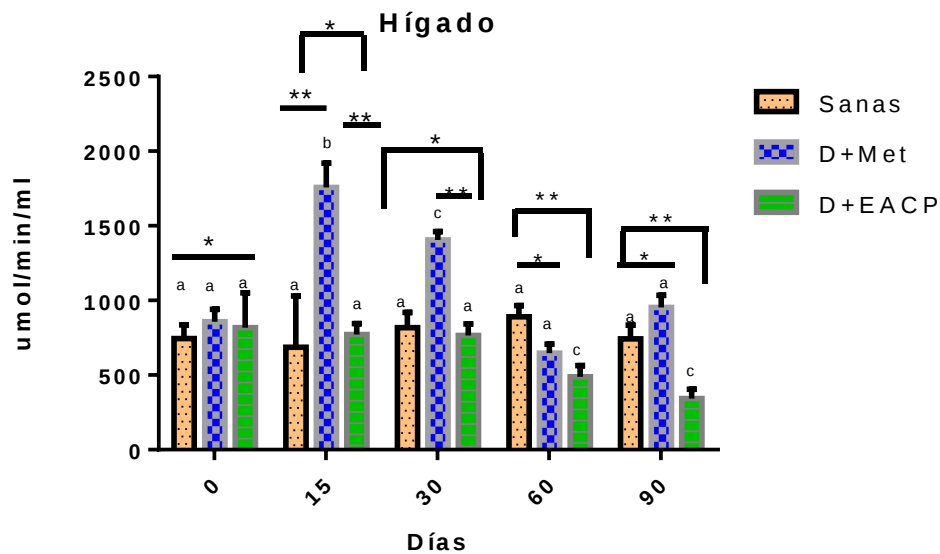


FIGURA 26. Glutathión Transferasa (GST) en Hígado. La gráfica representa los valores obtenidos en los diferentes tiempos analizados en los tratamientos crónicos. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: La actividad de la enzima se mantuvo constante y estable durante los 90 días de observación, sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con metformina: En el tiempo 15 se observa un incremento en la actividad de la enzima, sin embargo, para el resto de los tiempos, se observa una disminución, para el tiempo 60 y 90 se mantuvo constante, sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con EACP: La actividad de la enzima se mantuvo constante y estable durante los primeros 30 días de observación, sin tener cambios significativos. En los tiempos 60 y 90, se observa una disminución en la actividad de la enzima, si embargo se mantiene constante, sin tener cambios significativos.

Para el tiempos 0, se observa, que nuestros tres grupos no tuvieron diferencias significativas, sin embargo, en el tiempo 15, el grupo tratado con metformina tiene la mas alta actividad de la enzima en comparación con el grupo tratado con metformina y el grupo tratado con EACP. En el tiempo 90, se observa que el grupo sano y el grupo tratado con metformina, no tuvieron diferencias significativas, sin

embargo , el grupo tratado con EACP, tuvo la menor actividad enzimática, en comparación con el grupo sano y el grupo tratado con metformina.

7.7.4. Glutación Reductasa (GR).

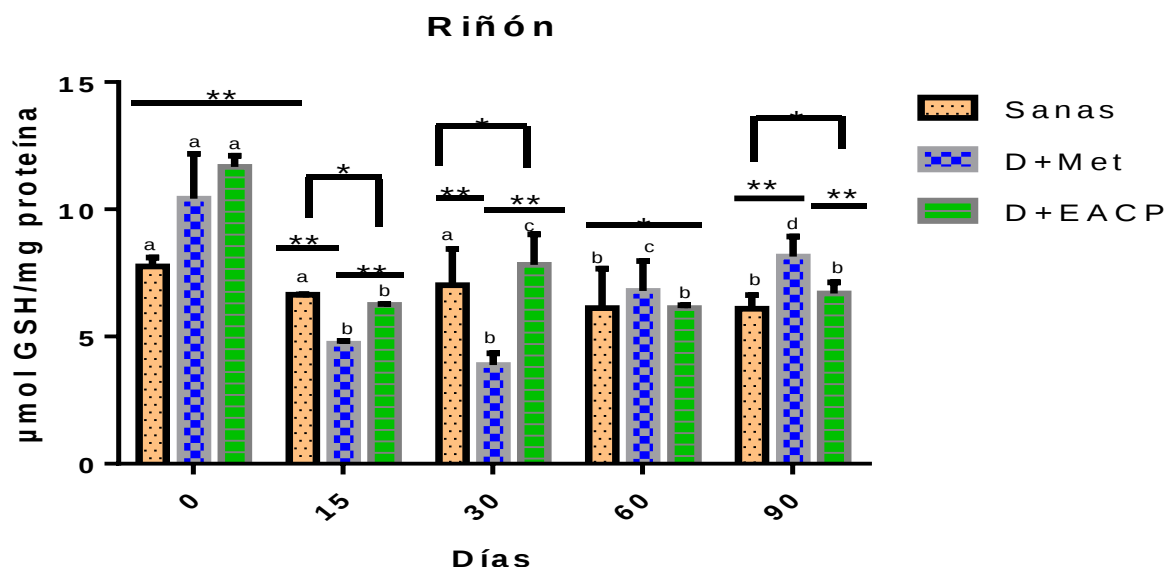


FIGURA 27. Glutación Reductasa (GR) en Riñón. La gráfica representa en el eje de las ordenadas, la actividad de la enzima en glutatión reducido (GSH) formado en $\mu\text{mol/mg proteína}$. los valores obtenidos, y en el de las abscisas los diferentes tiempos analizados en el tratamiento crónico. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Durante los primeros 30 días, la actividad de la enzima se mantuvo estable sin tener cambios significativos, sin embargo, del tiempo 60 al tiempo 90, se observa una leve disminución de la actividad de la enzima, de igual forma manteniéndose estables durante estos días.

Grupo diabético con metformina: Para el tiempo 0, se observa una alta actividad de la enzima, conforme se fue administrando el tratamiento de manera crónica, esta actividad fue disminuyendo, lo cual se puede observar del tiempo 15 al tiempo 30. Sin embargo, ya para el tiempo 60 y el tiempo 90, se observa un leve incremento en la actividad de la enzima.

Grupo diabética con EACP: Se observa en el tiempo 0, un incremento en la actividad de la enzima, posteriormente para el tiempo 15, esta disminuyó, sin embargo, para el tiempo 30, volvió a tener un leve incremento en la actividad enzimática. Ya para los tiempos 60 y 90, esta volvió a disminuir, manteniéndose estable la actividad de la enzima.

Para el tiempo 0, se observa que en el grupo control tuvo la menor actividad de la enzima en comparación con los otros dos grupos, el grupo tratado con EACP fue el que presentó la mayor actividad de la enzima en comparación con los otros dos grupos. Conforme se fueron administrando los tratamientos, se observa que en el tiempo 15 y 30, el grupo control no tienen diferencias significativas con el grupo tratado con EACP. En el tiempo 60, ninguno de los tres grupos presentó diferencias significativas entre ellos. Para el tiempo 90, el grupo tratado con EACP no tuvo diferencias significativas con el grupo control, siendo el grupo tratado con metformina el más alto en cuestión de la actividad enzimática.

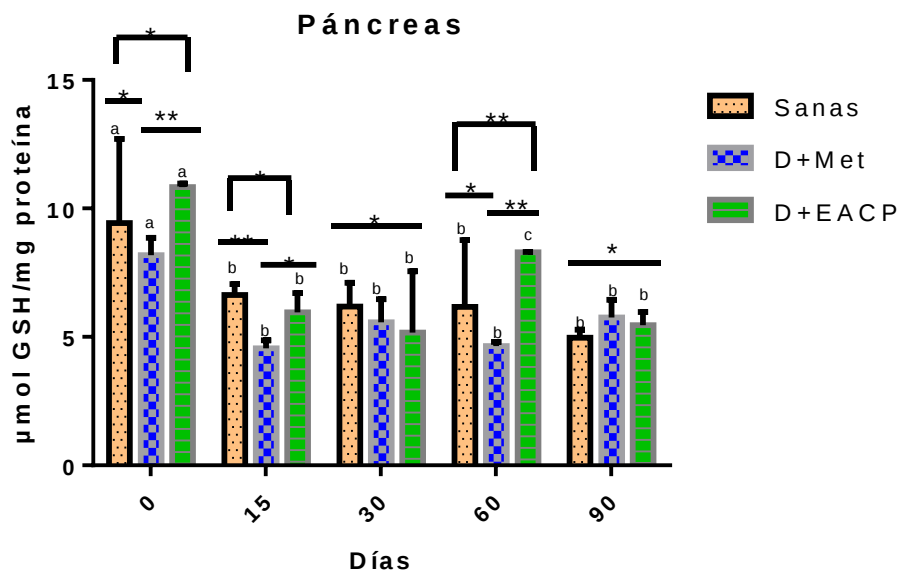


FIGURA 28. Glutación Reductasa (GR) en Páncreas. La gráfica representa en el eje de las ordenadas, la actividad de la enzima en glutatión reducido (GSH) formado en $\mu\text{mol/mg}$ proteína. los valores obtenidos, y en el de las abscisas los diferentes tiempos analizados en el tratamiento crónico. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Para el tiempo 0, se observa un incremento en la actividad de la enzima, posteriormente en el transcurso del tiempo de observación se observa un decremento en la actividad de la enzima, manteniéndose estable.

Grupo diabético con metformina: Para el tiempo 0, se observa elevada la actividad de la enzima, posteriormente en el transcurso de administración del fármaco, se observa un decremento en la actividad de la enzima, manteniéndose estable, sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con EACP: En el tiempo 0, se observa un valor elevado de la actividad enzimática, para los tiempos 15 y 30 se observa un decremento en la actividad de la enzima, dicha actividad se mantiene constante sin tener cambios significativos. Para el tiempo 60, tuvo un ligero incremento en la actividad enzimática, sin embargo, al final del tratamiento, para el tiempo 90, esta actividad enzimática volvió a bajar, sin tener cambios significativos con los tiempos 15 y 30.

El grupo control, no tuvo diferencias significativas con el grupo tratado con EACP en el tiempo 0, siendo el grupo tratado con metformina, el que tuvo menor actividad enzimática. Conforme pasaba el tiempo de administración, se observa que para el

tiempo 15, el grupo control y el grupo tratado con EACP no presentaron cambios significativos, para el tiempo 30, los tres grupos no presentan diferencias significativas, de igual forma para el tiempo 90, se observa que no hubo diferencias significativas entre los tres grupos estudiados.

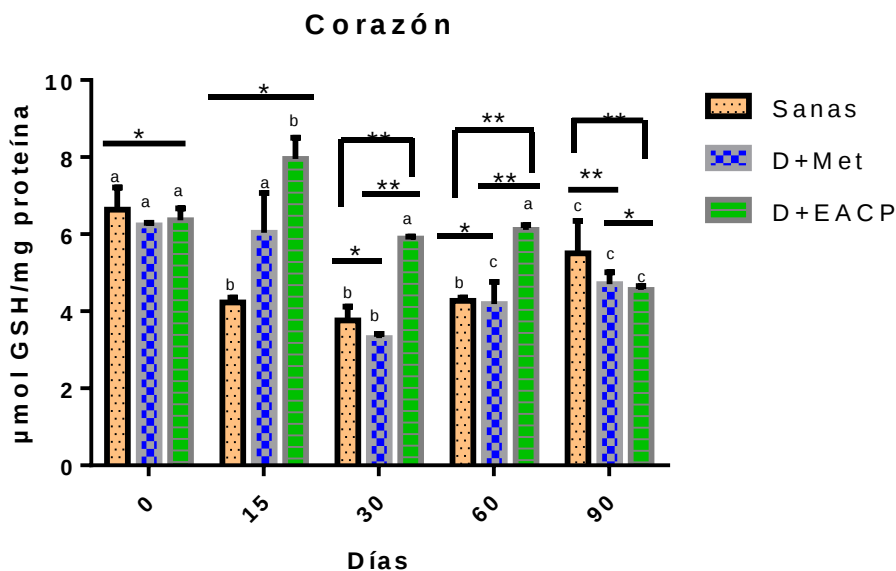


FIGURA 29. Glutación Reductasa (GR) en Corazón. La gráfica representa en el eje de las ordenadas, la actividad de la enzima en glutatión reducido (GSH) formado en $\mu\text{mol/mg}$ proteína. los valores obtenidos, y en el de las abscisas los diferentes tiempos analizados en el tratamiento crónico. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: Se observa, que para el tiempo 0, comenzó con una alta actividad de la enzima, sin embargo, para el tiempo 15 hasta el tiempo 60, dicha actividad enzimática disminuyó, manteniendo constante y sin tener cambios significativos. Para el tiempo 90, esta actividad enzimática tuvo un ligero incremento.

Grupo diabético con metformina: En los primeros 15 días de tratamiento, se observa una elevada actividad de la enzima, en el tiempo 30 tuvo una disminución en la actividad enzimática, sin embargo, del tiempo 60 al tiempo 90, volvió a tener un ligero incremento, la cual se mantuvo constante y sin tener cambios significativos.

Grupo diabético con EAPC: En el tiempo 15 se observa el mayor incremento en la actividad de la enzima, en comparación con el resto. Para los tiempos 0,30 y 60, se observa una disminución en la actividad de la enzima en comparación del tiempo 15, además de que en dichos tiempos se mantuvo constante sin tener cambios significativos en la actividad de la enzima. Para el tiempo 90 esta actividad enzimática volvió a bajar.

En los primeros 15 días de estudio, se observa que ninguno de nuestros tres grupos tuvo diferencias significativas. Para los tiempos 30 y 60, el grupo tratado con metformina no tuvo diferencias significativas con el grupo control. En el tiempo 90, el grupo tratado con metformina no tuvo diferencias significativas con el grupo tratado con el EACP.

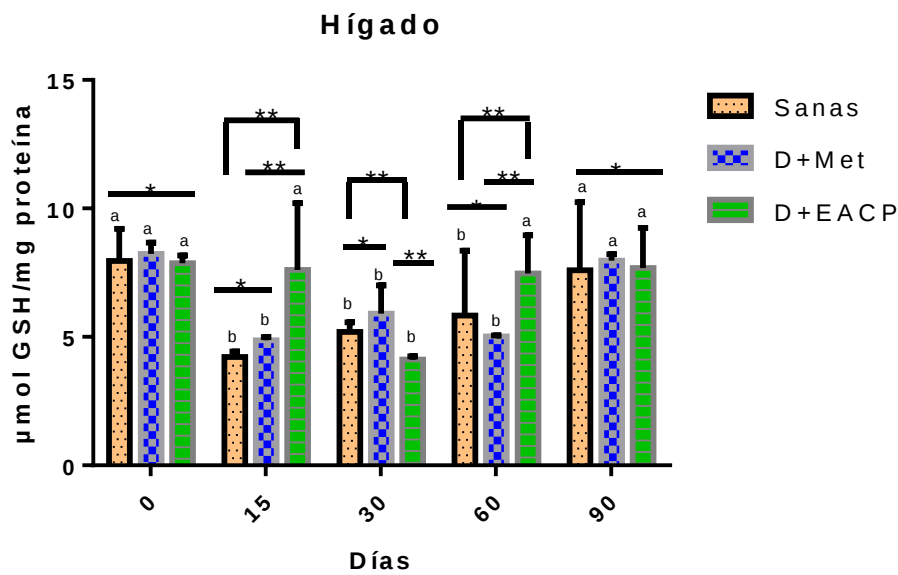


FIGURA 30. Glutación Reductasa (GR) en Hígado. La gráfica representa en el eje de las ordenadas, la actividad de la enzima en glutatión reducido (GSH) formado en $\mu\text{mol/mg}$ proteína. los valores obtenidos, y en el de las abscisas los diferentes tiempos analizados en el tratamiento crónico. Las letras representan diferencias significativas en el tiempo dentro de un mismo grupo. *, ** Representan diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$ ($n=6$).

Grupo control: En el tiempo 0, comienza con una elevada actividad enzimática, sin embargo, para los tiempos 15, 30 y 60, esta actividad enzimática se mantuvo estable durante dicho tiempo. En el tiempo 90, hubo un ligero incremento, el cual no tiene cambios significativos con el tiempo 0.

Grupo diabético con metformina: Para el tiempo 0, comienza con una elevada actividad enzimática, sin embargo, para los tiempos 15, 30 y 60, esta actividad enzimática se mantuvo estable durante dicho tiempo. En el tiempo 90, hubo un ligero incremento, el cual no tiene cambios significativos con el tiempo 0.

Grupo diabético con EACP: El tiempo 30, presenta la mayor disminución en la actividad de la enzima, para el resto de los tiempos, se mantuvo estable la actividad de la enzima, sin tener cambios significativos.

Para el tiempo 0, nuestros tres grupos estudiados, no tuvieron diferencias significativas, del tiempo 15 al tiempo 60, el grupo tratado con metformina no tuvo diferencias significativas con el grupo control. En el tiempo 90 se observa que los tres grupos no presentan diferencias significativas, manteniendo la misma actividad de la enzima.

VII. Discusión.

La producción aumentada o acelerada de radicales libres (RL) y de especies reactivas de oxígeno (ERO) conocida como estrés oxidativo, se presenta en diversas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, así como su relación con el desarrollo de diversas enfermedades, como en la diabetes mellitus. (Villa, L, Nava, AA, et al 1999). La hiperglicemia sostenida favorece la autooxidación de la glucosa lo cual causa desbalance en los mecanismos de oxidación y anti oxidación que conlleva a hiperproducción de radicales libres de oxígeno que en sus mecanismos de toxicidad oxidan lípidos, proteínas, lo que causa disturbios en la mecánica metabólica del organismo (Alcides, Gonzales Y et al.,2013).

Por lo anterior, en este trabajo de tesis se evaluaron las variaciones de las principales enzimas antioxidantes en los tejidos más afectados en la diabetes mellitus, en tres condiciones experimentales en ratas Wistar macho sanos como control positivo, diabéticos tratados con metformina y diabéticos tratados con el extracto acuoso de *Cuphea procumbens* (EACP).

Los animales utilizados se les indujo la diabetes tipo 2, inducido con fructuosa al 60% que se administraron durante un periodo de 3 meses para que se presente la enfermedad, en este periodo no se le administraron tratamientos. El tratamiento crónico fue por 3 meses. Estos grupos corresponden a una investigación previa de nuestro grupo de trabajo donde se comprobó que la Hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*) tiene efecto hipoglucemiante. (Orozco M. F. M. y Fenton N. B. 2018).

Existe un sistema de defensa celular contra estas especies reactivas de oxígeno, al que contribuyen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los primeros se encuentran enzimas como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Villa, L, Nava, AA, et al 1999). Las especies reactivas de oxígeno incluyen al ion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilos ($\bullet OH$) y la concentración de ROS es un marcador directo que representa el estrés oxidativo en el cuerpo (Kannan-K y Jain-SK.2000).

El sistema de defensa antioxidante de las células vivas, constituye un mecanismo adaptativo de gran relevancia, destacándose las actividades enzimáticas del superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX). (Alcides, Gonzales Y et al.,2013, Hu R, et al 2019).

En cuanto al modelo experimental, se utilizó la inducción de diabetes con la administración de fructosa. Se sabe que la dieta alta en fructosa provoca la alteración del metabolismo de lípidos, disminuye la sensibilidad a insulina y genera alteraciones en el piruvato deshidrogenasa hepática. La fructosa salta dos pasos regulatorios de la glucólisis, la glucosidasa y fosfofructocinasa, por lo que potencialmente aumenta la acumulación de intermediarios glucolíticos que activan vías de estrés (Kelley GL, et al 2014).

Como se mencionó anteriormente, durante las manifestaciones de la diabetes hay un incremento de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), que incrementan la lipoperoxidación, daño al DNA y la degradación de proteínas. En la diabetes tipo 1 los ROS se encuentran relacionados con la disfunción de células- β (Cnop 2005), iniciado por reacciones autoinmunes y citocinas proinflamatorias. En la diabetes tipo 2, los ROS activan las vías apoptóticas en las células- β , impiden la síntesis de insulina y también contribuyen a la resistencia a la insulina (Evans JL et al, 2003; Simmons RA, 2006).

Muchos intentos terapéuticos han incluido el uso de hipoglucemiantes orales. Los agentes más utilizados son (sulfonilureas, biguanidas, Meglitinidas, thiazolidinedionas, e inhibidores de α -glucosidasas), que se usan como monoterapias o en combinaciones para obtener mejores controles de la glucemia. La metformina es una biguanida que se utiliza ampliamente en el control de la diabetes tipo 2. Disminuye las concentraciones circulantes de glucosa sin provocar la hipoglucemia (Scheen AJ, 1996).

La Metformina disminuye la producción de glucosa endógena en pacientes con DM2. La activación de AMPK resulta en la supresión de la producción de glucosa

hepática y el aumento en la captación de glucosa en el musculo esquelético .Su paso al espacio intracelular se da en razón de los Receptores Orgánicos de Cationes (OCT –por sus siglas en inglés-) que están divididos en cinco subtipos; de éstos, el OCT1 y OCT3 son los principales implicados en su función antidiabética porque están localizados principalmente en los hepatocitos. (Arocha, J.D, et al 2017). Los principales efectos metabólicos de la metformina, se resumen en, (A). Efectos hipoglucemiantes. Disminuye la absorción intestinal de carbohidratos (reduce la hiperglucemia posprandial), inhibición de la gluconeogénesis hepática, favorece el transporte de insulina dentro del músculo esquelético. (B). Efecto protector antidiabético. Protección de la célula beta pancreática de la glucolipotoxicidad. Efecto hepatoprotector: Disminución de resistencia hepática a la insulina (Arocha, J.D, et al 2017).

Estudios genéticos con ratones, propusieron que los responsables del efecto terapéutico del fármaco. Un mimético del AMP suprimió la producción de glucosa en los hepatocitos de animales carentes del gen de la AMPK. Esto indica que es el AMP en sí mismo, pero no la enzima AMPK, el que podría desempeñar un papel importante en la inhibición de la producción hepática de glucosa (Hickman MA, Bride R, et al. 2013).

En los resultados obtenidos al administrar el EACP, fueron favorables, debido a que se pudo observar que hubo una disminución en la actividad enzimática de SOD, GPX, GST, GR, y por consiguiente una disminución en la hiperglucemia, esto debido a las fuentes de polifenoles.

Estos compuestos pueden influir en el metabolismo de la glucosa por varios mecanismos, como inhibición de la digestión de carbohidratos y absorción de glucosa en el intestino, estimulación de insulina, secreción de las células β pancreáticas, modulación de la liberación de glucosa del hígado, activación de insulina en los receptores, captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina, y modulación de la producción de glucosa hepática. (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010). Los polifenoles tienen actividad antioxidante y pueden inhibir el producto final de glicación avanzada (Kim, Y et al. 2016). Se ha demostrado que una variedad

de polifenoles inhibe las actividades de α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro*. Los polifenoles inhibidores incluyen flavonoides (antocianinas, catequinas, flavanonas, flavonoles, flavonas e isoflavonas), ácidos fenólicos y taninos (proantocianidinas y elagitaninos). (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010).

Los fitoquímicos con actividad antioxidante ofrecen una gran esperanza. Como una de las sustancias metabólicas secundarias críticas, los polifenoles existen ampliamente en una variedad de plantas y se han utilizado para diversos fines debido a su gran capacidad antioxidante. Los polifenoles se caracterizan por el fenol como el esqueleto básico, y la sustitución polihidroxílica del anillo de benceno se puede clasificar en ácidos fenólicos, acetofenonas, ácido fenilacético, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos y flavonoides (Hu R., y col., 2019).

Los polifenoles en las plantas tienen diversas funciones, sirven para combatir el estrés generado por organismos patógenos y por predadores. Son precursores de compuestos de gran complejidad en el proceso de la regulación y control del crecimiento de plantas, así como la defensa contra patógenos. Tienen la capacidad de actuar como donadores de hidrógeno o quelar iones metálicos como cobre e inhiben la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas características están asociadas con un descenso de riesgo de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cánceres gastrointestinales y de colon, cáncer de mama y de ovario, leucemias (Santos, Sánchez N, et al 2019).

Los compuestos fenólicos reducen o inhiben los radicales libres mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno, de su grupo hidroxilo. El mecanismo de reacción de un compuesto fenólico con un radical peroxilo ($\text{ROO} \bullet$) implica una transferencia concertada del catión de hidrógeno del fenol al radical, formando un estado de transición de un enlace H-O con un electrón. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se reduce fuertemente cuando el medio de reacción consiste en un disolvente propenso a la formación de enlaces hidrógeno con los compuestos fenólicos. También favorecen la ionización de los fenoles a anión fenóxidos, que pueden reaccionar rápidamente con radicales peroxilo, a través de una transferencia de electrones. El efecto general del solvente sobre la actividad

antioxidante de los compuestos fenólicos depende en gran medida de grado de ionización de los últimos compuestos (Forti MC, 2007).

Los antioxidantes no enzimáticos (glutación reducido) actúa de forma sinérgica para atrapar los radicales libre formados en los sistemas biológicos, por lo que previenen a la célula del daño oxidativo. GSH es un tripéptido rico en tioles que juega un papel en el balance del estrés oxidativo al proteger a las células y tejidos (Ahmed MM, y col, 2011).

Los agentes antidiabéticos mantienen los niveles de GSH que se utilizan durante la diabetes y por lo tanto también estabilizan la peroxidación de lípidos.

El grado de efectos de agentes antidiabéticos son metformina (MET) >repaglinida (REP > glibenclamida (GLI), debido a que proveen una protección contra la lipoperoxidación y por lo tanto contribuyen a la protección contra el daño oxidativo en la diabetes en el páncreas (Obi B Ch y col, 2016).

Los antioxidantes inhiben la producción de especies reactivas de oxígeno atrapando los radicales libres. Los antioxidantes naturales fortalecen las defensas de los antioxidantes endógenos de ROS y reestablecen el equilibrio óptimo al neutralizar las especies reactivas (Azab-AE, Mohamed-Omar-Albasha-MO, 2018). Las actividades antioxidantes de los fenoles están relacionadas con un número de diferentes mecanismos, tales como eliminación de radicales libres, donación de hidrógenos, atrapamiento del oxígeno singlete, quelación de iones metálicos y acción como sustrato para radicales como superóxido e hidroxilo (Adwas-AA, Elsayed-ASIE y col, 2019).

A continuación, se mencionarán algunos extractos, en los cuales se ha demostrado su efecto hipoglucemiante y la reducción en el estrés oxidativo.

Soya (soja) fermentada: Un modelo diabético inducido por estreptozotocina (STZ) alimentado con soja fermentada, un alimento coreano llamado cheonggukjang (5 g / 100 g de dieta durante 6 semanas), mostró que la concentración de insulina en el

páncreas fue mayor en los ratones alimentados con soja que en los ratones control no tratados. Además de mejorar la producción de insulina en el páncreas, el tratamiento también pareció contribuir a mejorar sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010). Debido a que la diabetes y sus complicaciones representan un problema de salud público, se buscan alternativas para apoyar a los tratamientos existentes, como son el uso de plantas medicinales.

Vaccinium angustifolium: Extractos de etanol de la raíz, el tallo, la hoja y la fruta del arbusto canadiense, el arándano *Vaccinium angustifolium*, una fuente muy rica de flavonoide, Solo se observó un ligero aumento en la secreción de insulina con él con extractos de hojas y tallos, pero se encontró que el efecto sobre la tasa de proliferación celular aumentó significativamente por el tratamiento con el extracto de fruta en comparación con el control, sugiriendo una capacidad potencial para frenar el daño de las células β en el síndrome metabólico. (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010).

Quercetina: La quercetina, mostro la restauración de las células β , cuando se utilizó como suplemento dietético. (0,5% de la dieta durante 14 días) en ratones diabéticos inducidos por STZ. El análisis mostró que La quercetina restableció la capacidad de proliferación celular inhibida por el tratamiento con STZ y resultó en un mayor nivel de insulina en plasma. Además, los marcadores de estrés oxidativo se redujeron en el páncreas, mejorando el daño oxidativo asociado con la diabetes., la preservación de las células de los islotes y la restauración de La producción de insulina también se observaron. (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010).

Eugenia jambolana: Los extractos de semillas de *Eugenia jambolana* aumentaron la secreción de insulina de islotes aislados de ratas diabéticas inducidas por STZ en presencia de glucosa 10 mM; extracto acuoso de *Abutilon indicum*, una planta utilizada como medicina tradicional en Tailandia, estimuló la secreción de insulina de islotes de rata aislados. (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010).

Se ha informado que varios alimentos y extractos a base de plantas mejoran la absorción de glucosa *in vitro*. Se informó que el extracto polifenólicos del té verde

regula la expresión de genes implicados en la captación de la glucosa y vías de señalización de insulina en el tejido muscular de ratas con síndrome metabólico inducido por una dieta alta en fructosa. (Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010).

Cecropia obtusifolia es una planta comúnmente utilizada por los mexicanos, para tratar la DM2. Los estudios han evaluado su efecto hipoglucémico en modelos animales y en pacientes con DM2. La planta contiene ácido clorogénico, un inhibidor de glucosa. Prueban la hipótesis de que va dirigido a la gluconeogénesis con un inhibidor de glucosa-6-translocase de fosfato, podría resultar en una reducción de la función hepática en la producción de glucosa. Para este propósito, probaron los efectos de la planta en gluconeogénesis (in vivo) y en actividad enzimática (in vitro). Los autores llegaron a la conclusión de que los resultados implicaron que la administración de la planta podría mejorar el control glucémico al bloquear el hígado y la salida de glucosa, especialmente en ayunas. (Adolfo, AC 2012).

Malmea depressa (Baill.) RE Fries. (Annonaceae): Esta planta se usa tradicionalmente en las comunidades mayas de Sureste de México para tratar la DM2. Una infusión de corteza de raíz, se toma durante todo el día entre comidas. Los autores probaron la inhibición de la gluconeogénesis in vivo mediante la realización de Realizar una prueba de tolerancia al piruvato en ratas n5-STZ después de 18 horas. Período de ayuno Los efectos de los extractos en la actividad G-6-P fueron analizados in vitro con microsomas de hígado de rata intactos. En esto trabajar el extracto etanólico de la corteza de la raíz de forma dosis-dependiente inhibió un pico de glucosa en el modelo animal. Los autores sugieren que la administración de la planta puede mejorar la glucemia, bloqueando la producción de glucogeno hepática. (Adolfo-AC, 2012).

Debido a que la diabetes y sus complicaciones representan un problema de salud público, se buscan alternativas para apoyar a los tratamientos existentes, como son el uso de plantas medicinales.

Lo que se ha reportado respecto a las enzimas antioxidantes con el uso de la metformina es que incrementa la actividad de la catalasa CAT y SOD. También incrementa de forma significativa la concentración de GSH glutatión en suero. Esto concuerda perfectamente con lo que está reportado anteriormente (Onyeka-CA y col, 2013; Satheesh-MA y Pari-L, 2004).

La actividad de la SOD disminuye en el grupo de ratas diabéticas tratadas con metformina a lo largo del estudio crónico en los tejidos analizados. Esto coincide perfectamente con lo reportado, ya que la metformina, es uno de los hipoglucemiantes orales más utilizados, al reducir los niveles circulantes de glucemia, sin provocar hipoglucemia (Scheen, AJ 1996), reduce la producción de especies reactivas de oxígeno.

Respecto a la acción de el extracto acuoso sobre las enzimas antioxidantes analizadas, se observó que al inicio se encontraron más elevadas y conforme se analizaron en los diferentes tejidos y a lo largo del tiempo disminuyeron.

Al inicio, en el tiempo cero, los animales se encontraban con un tratamiento de tres meses para que se instalara la diabetes (Orozco, M y Fenton, N.B, 2018). Esto generó un estado de alto estrés oxidativo, por una sobreproducción de ROS.

Los niveles de enzimas antioxidantes se vieron incrementados en la valoración de los 15 días, estos resultados coinciden perfectamente con lo previamente reportado, donde los polifenoles provocan un incremento en las concentraciones enzimáticas, como medio de contrarrestar el estrés oxidativo (Hu-R, y col 2019).

Conforme fue transcurriendo el tiempo, el extracto, que tiene el efecto hipoglucemiante comenzó a disminuir los niveles normalizándolos en la semana 6 y manteniéndolos hasta la semana 12 (Orozco, Montes, 2018).

Debido a que existe una disminución de la glucosa circulante, esto provoca que se reduzca la actividad de las enzimas, esto se observó en los tejidos y enzimas antioxidantes analizadas.

Debido a que los componentes activos de las plantas generan un mayor efecto antioxidante (Chávez N, 2020), se observó que en los grupos que recibieron el

EACP mostraron una disminución aún menor que el control positivo que fue la metformina.

En nuestro grupo de trabajo también se realizó el análisis histopatológico de hígado y páncreas (Gómez, G.R y Fenton, N.B, 2019). El hígado de ratas diabéticas mostró tener esteatosis. La acumulación de grasa y el grado de inflamación correspondió al avance de la enfermedad. El GSH reducido disminuyó, reduciendo la proporción de GSH/GSSG. Esto coincide con lo previamente reportado respecto al hígado graso y la disminución de GSH (Jarukamjorn, K et al, 2016).

El extracto acuoso de la Hierba de la calavera (EACP), tiene efecto hipoglucemiante. (Orozco M,2018).

No se conoce el efecto que tiene la administración oral del EACP en las enzimas antioxidantes.

Por los resultados obtenidos en este trabajo sugerimos que el EACP es una alternativa viable de apoyo a la metformina en modelos de rata Wistar, presentando valores de actividad enzimática semejantes o inferiores al grupo tratado con metformina.

IX Conclusiones.

La administración crónica de EACP en animales con diabetes mellitus tipo 2 reduce la actividad de enzimas antioxidantes. Por lo cual podemos concluir que *Cuphea procumbens*. Modifica la actividad de enzimas antioxidantes.

Respecto a la modificación en la actividad enzimática por la administración crónica de EACP se concluye lo siguiente:

- SOD: Mostró una reducción en todos los tejidos a partir del día 30.
- GPX: En Riñón y corazón se observó una reducción significativa en comparación con metformina. Mientras que, en páncreas e hígado, no se obtuvo una diferencia significativa con respecto al grupo con metformina.
- GST: El páncreas e hígado, presentaron menor actividad de la enzima en comparación al grupo con metformina. En corazón y riñón, no se observaron diferencias significativas con los otros grupos.
- GR: En riñón fue inferior al grupo con metformina. En páncreas, corazón e hígado, no se encontraron diferencias significativas.

X. Perspectivas.

- Continuar con la investigación del EACP, para determinar cuáles son los metabolitos secundarios que más efecto tienen sobre los RL para la disminución del estrés oxidativo y la hiperglucemia.
- Identificar cual o cuales metabolitos secundarios son los responsables en la regulación de la actividad de las enzimas.
- Realizar pruebas de Farmacología para identificar la dosis óptima para humanos.
- Si la aplicación de EACP es efectiva en humanos, se sugiera la producción de una forma farmacéutica o suplemento alimenticio que la población pueda utilizar apoyando al tratamiento hipoglucemiante, de manera práctica y económica.

XI. Bibliografía.

1. Adwas AA, Elsayed ASIE, Elsayed EA, Quwaydir FA. 2019. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng.* 2019;6(1):43–47.
2. Ahmed MM, Ahmed AE, Hala S A G, Gehan MM and Fahad AA. 2011. Protective effects of simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, against oxidative damage in experimental diabetic rats. *Int. J. Pharmtech Res.* 3(3):1780-1795.
3. Alcides, G, Gonzales Y et al. 2013. Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas Wistar. *Rev. Med. Electrón.* Vol.35 No.2.
4. Aliseda, D., Berástegui, L. .2008. Retinopatía diabética, *Anales Sis San Navarra* Vol. 31 No3. Pamplona 2008.Pp 24-34.
5. Álvarez, R. 2006. Retinopatía diabética, Vol. 31, N.3. Pp.93-94.
6. Álvarez, 2013. Antioxidantes consumo de antioxidantes naturales en adultos mayores entre 65 y 75 años con dislipidemia. Pp 14-18.
7. Álvarez, E, et al. 2002, Actividad biológica de los flavonoides (I) acción frente al cáncer, Vol. 22 Núm. 10. Pp 132.
8. Araya, A, Olmos, P, et al. 2009. Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas, *Rev.Med. Chile*, Vol. 137 No 10.
9. Arizaga, S, et al, 2018. Monografía de las plantas medicinales de Michoacan. UNAM. Pp.54.
10. Arocha, J.D, et al. 2017. Metformina, el fármaco paradigma del siglo XXI. *MED INTERNA (CARACAS) VOLUMEN 33 (1) – 2017* Pp 5
11. Ávila, L, 2010.Meglitinidas. [en línea]. <http://www.grupodiabetessamfyc.es/index.php/guia-clinica/guia-clinica/tratamiento/antidiabeticos-orales/150.html>.
12. Azab AE, Mohamed Omar Albasha MO. 2018. Hepatoprotective Effect of Some Medicinal Plants and Herbs against Hepatic Disorders Induced by Hepatotoxic Agents. *Journal of Biotechnology and Bioengineering* 1(1): Volume 2, Issue 1, 2018: 8-23.
13. Beyer WF and Fridovich I. (1987) Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.
14. Bonala, I.F, Irigoyen, M.E et al. 2014. Estrés oxidante: El sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias clínicas.* 2014; 15(1): 2-8.
15. Boyland, E. and chassaud, L.F. 1969. The role of Glutathione and Glutathione S Transferase in Meroptin Acid Biosynthesis *Mol* 32: 173-219
16. Bravo, G, Flumian, C, et al. 2010. Retinopatía diabética. *Mecanismos básicos y avances terapéuticos*, tomo 60 No1.Pp 42-43.

17. Campo, M, Posada, G.2008. Factores de riesgo para Diabetes Mellitus Gestacional en población obstétrica. RevCesMed, Volumen 22, No1. Pp 60-63.
18. Castillo, A.2015.Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo2(DM2). [en línea]. <https://www.endocrino.org.co/wp-content/uploads/2015/10/Fisiopatologia de la Diabetes Mellitus Tipo 2 J Castillo.pdf>.
19. Castillo, Y, Riverón, G.2014. Superóxido dismutasa citosólicas y enfermedades genéticas, Rev. CUBANA GENET.Pp 6-8.
20. Cervantes, R D, Presno, J M. 2013.Fisiopatología de la Diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas, revista de endocrinología y nutrición, Vol. 21, No 3. Pp 99-102.
21. Cisneros, E, et al. 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres III Rev cubana Invest Biomed V.16 Ciudad de la habana.
22. Cisneros, E. 1995. La Glutación reductasa y su importancia biomédica, Rev. Cubana Inves Biomed 14(1).
23. Chance, B Maehly Y.C. 1953. Assay of catalase and peroxidase. Methods Enzymology. 2: 766-755.
24. Chaves N, Santiago A and Alías JC. 2020. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. Antioxidants, 9, 76: 1-14. doi:10.3390/antiox9010076.
25. Ciclo de óxido-reducción del glutatión. 2009. [en línea]. https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Ciclo-de-oxido-reduccion-del-glutation-GPx-Enzima-glutation-peroxidasa-GRd_fig2_250372121
26. Cluster salud. 2019. La diabetes sigue imparable en México. [en línea]. <https://clustersalud.americaeconomia.com/sector-publico/la-diabetes-sigue-imparable-en-mexico>.
27. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, J'orns A, Lenzen S, and Eizirik DL. 2005. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes:many differences,few similarities. Diabetes 54(2): S97–S107.
28. Constanza, L, Muñoz, M.2012. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno, Vol.10 No18. Pp 222.
29. Conde, A M, Paredes, C M, et al. 2002. Neuropatía diabética, Vol. 5 No1 y 2. Pp 11-12.
30. Coronado, H, Salvador, M. 2015. Antioxidantes perspectiva actual para la salud humana. Rev. Chil NUTR, Vol.42 No.2.
31. Coronado, H, Salvador, M. 2015. Antioxidantes perspectiva actual para la salud humana. Rev. Chil NUTR, Vol.42 No.2. Pp 207.
32. Corporation Scientifica. Volume 2016, Article ID 5029414, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5029414>
33. Costa, JE. et al.2014. Adherencia terapéutica y flexibilidad en el uso de las insulinas basales. Rev B Aire Med. 74 (4).

34. Cruz, D, López V.N. 2009. Plantas medicinales. [en línea] <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/fig/Plantas medicinales Seminario Final Silva Nataly.pdf>.
35. Cruz J, et al. 2011. Estrés Oxidativo y Diabetes Mellitus. Revista Cubana Patología Clínica.58 (I): 4-15.
36. Dañino, M C, Reyes D C, et al. 2017 Complicaciones agudas de la diabetes mellitus tipo II, DICIIM CECAM. [en línea] <https://pdfs.semanticscholar.org/51a6/4d719bede441f56190deb33346c65bbd69e8.pdf>.
37. DGE. 2019. Diabetes Mellitus Tipo2 Hospitalaria Informe Trimestral de Vigilancia Epidemiológica. [en línea] https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/566068/BOL_DMT2_4TOTRI_M_2019.PDF.
38. DGE. 2020. Diabetes Mellitus Tipo2 Hospitalaria Informe Trimestral de Vigilancia Epidemiológica. [en línea]. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/566071/BOL_DMT2_2DORI_M_2020.pdf
39. Diabetes, OMS. 2019. [en línea] //www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/.
40. Diaz, O. et al. 2011. Manual para el diagnóstico y el tratamiento del paciente diabético en el nivel primario de salud. La Habana: MINSAP. P.4-95.
41. Dupas, J., Goanvec, C., Feray, A., Guernec, A., Alain, C., Guerrero, F., & Mansourati, J. (2016). *Progressive Induction of Type 2 Diabetes: Effects of a Reality-Like Fructose Enriched Diet in Young Wistar Rats*. *PLOS ONE*, 11(1), e0146821.
42. Enfermedad Cardiovascular, ES Maestras. Diabetes mellitus. 2011. [en línea] <http://www.esmaestras.org/mi-salud/diabetes/complicaciones.php>.
43. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, and Grodsky GM. 2003. Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction?. *Diabetes*- 52(1): 1–8.
44. Fernández. L. 2020. Ranking de los países con mayor número de enfermos de diabetes en 2019. [en línea]. <https://es.statista.com/estadisticas/612458/paises-con-mayor-numero-de-personas-con-diabetes/#:~:text=Se%20estima%20que%20la%20diabetes, personas%20m%C3%A1s%20que%20en%202011>.
45. Fernández, J. et al. 2012. Diagnóstico y tratamiento en medicina interna. La Habana. Ciencias médicas. 391-401.
46. FLAVONAS. 2017 QUÉ SON, PARA QUÉ SIRVEN, ALIMENTOS [en línea] <https://www.flavonoides.org/flavonas/>
47. Foti MC. Antioxidant properties of phenols. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(12):1673-1685. DOI: 10.1211/jpp.59.12.0010.

48. García, L, Pérez, B.E, et al. 2009. Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control de la diabetes. [en línea] <https://www.veralmex.com/pdf/glucemico.pdf>. Pp 230
49. Gasteiz, V. 2008 Guías de práctica clínica sobre Diabetes Mellitus Tipo 2. [en línea] https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2018/12/GPC_429_Diabetes_2_Osteba_compl.pdf.
50. Glutation reducido. 2018 [en línea] <https://terapiabajardepeso.blogspot.com/2018/08/glutation-reducido.html>
51. Glutation. 2008. [en línea] <https://www.coenzima.com/glutatin>
52. Gómez, A M. 2015. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo I. [en línea] https://www.endocrino.org.co/wp-content/uploads/2015/10/Fisiopatologia_de_la_Diabetes_Mellitus_Tipo_1_AM_Gomez.pdf.
53. Gómez, L E, Cuevas, D B. 2007. SUPEROXIDO DISMUTASAS, [en línea] https://www.researchgate.net/publication/272181809_Superoxido_dismutasa
54. GPX Humanas. 2010. [en línea] <http://bioinformatica.upf.edu/2010/projectes10/Ey/GPXhumanas.html>.
55. Graham, SA, 1994, flora del bajío y de regiones adyacentes, Department of Biological Sciences Kent State University Kent, Ohio. E.U.A. Pp. 33-34.
56. Graham, SA, 1991. Flora de Veracruz. Instituto de ecología. Xalapa, Veracruz, Mexico.PP.54-55
57. Granados, A.2019. En México 8.6 millones de mexicanos reportan tener diabetes: INEGI. [en línea]. <https://www.24-horas.mx/2019/12/09/en-mexico-8-6-millones-de-reportan-tener-diabetes-inegi/>
58. Guía de prácticas de las complicaciones agudas de la diabetes.2017. [en línea] https://www.solucionesparaladiabetes.com/biblioteca/guias/GUIA_COMPLICACIONES_AGUDAS_Menarini-Diagnostics.pdf.
59. Gutiérrez, J. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de Radicales libres?, revista mexicana de ciencias farmacéuticas, Vol.37, numero.4. Pp 69-70.
60. Hanhineva, K, Törrönen, R, et al. 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism Int. J. Mol. Sci. 2010, 11, 1365-1402; doi:10.3390/ijms11041365.
61. Hayes, J P. 2008. Diabetes Mellitus tipo 1; Rev Soc Bol Ped. Pp 90-92.
62. Hickman MA, Bride R, et al. 2013. Metformina en Comparación con la Insulinoterapia en Embarazadas con Diabetes Manifiesta [en línea] https://www.siicsalud.com/pdf/novedades%20en%20cardiometabolismo_22014.pdf.
63. Hierbas y plantas medicinales. 2013.Propiedades medicinales hierba del cáncer [en línea] <https://hierbasyplantasmedicinales.com/propiedades-medicinales-hierba-del-cancer/>

64. Hu R, He R, Arowolo MA, Wu S, and He J. 2019. Polyphenols as Potential Attenuators of Heat Stress in Poultry Production. *Antioxidants* 8 (67): 1-11. doi:10.3390/antiox8030067.
65. Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). 2015 [en línea]: www.insp.mx/avisos/3652-diabetes-en-mexico.html.
66. Insulina, medicamentos y otros tratamientos para la diabetes NHI. 2015 [en línea] <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/insulina-medicamentos-tratamientos>. *J. Biol chem* 1974 nov 25, 249 (22).
67. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson Ch, and Chatuphonprasert W. 2016. A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. Hindawi Publishing
68. Jung, M., et al 2006. "Antidiabetics agents from medicinal plants." *Current Medicinal Chemistry* 13 1203- 1218
69. Kannan, K.; Jain, S.K.2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153–163.
70. Korc, I, Bidegain, M, Martell, M. 1995 Radicales libres Bioquímica y sistemas antioxidantes Implicancia en la patología neonatal. *Rev Med Uruguay* 1995; 11: 121-135.
71. Kudolo, G. B., et al. 2006. "The effect of the ingestion of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the pharmacokinetics of metformin in non-diabetic and type 2 diabetic subjects—a double blind placebo-controlled, crossover study." *Clin Nutr* 25(4).
72. Levemir. 2018. [en línea] https://www.vademecum.es/medicamento-levemir+flexpen_28230.
73. López, G. 2009. Diabetes mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico; Medwave. [en línea] <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/APS/4315>.
74. López, A, 2012. Naturalista [en línea] <https://www.naturalista.mx/photos/627324>
75. Maldonado, O, Jiménez, E, et al. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas *Rev Med UV*. Pp 34-37.
76. Mannervik, B. 1985) The isozymes of Glutathione transferase *Adv. Enzimol. Relat. Areas mo. Biol* 57:357-417
77. Martínez-Bonfil BP, Pineda-Montero M, López-Laredo AR, Salcedo-Morales G, Evangelista-Lozano S y Trejo-Tapia G. 2013. A propagation procedure for *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae) and antioxidant properties of wild and greenhouse-grown plants. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 12(1):1-14
78. Martínez, A. 2005. Flavonoides. Facultad de química farmacéutica, universidad de Antioquia. Pp 7-9.
79. Martínez, A. 2005. Flavonoides. Facultad de química farmacéutica, universidad de Antioquia. Pp 38.

80. Martínez, S, et al. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. (2002) XVII (6). Pp271-76.
81. Mata, M. 2008. Metformina y diabetes mellitus tipo 2 Aten Primaria. 2008;40(3):147-53.
82. Mayor, R. 2010. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidantes, Rev. Inst.Med. Trop.
83. Mediavilla, J J. 2001. Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. Vol. 27 No3. Pp 132-133.
84. Merzouki, A. et al. 2003. "Contribución al conocimiento de la medicina tradicional. Fitoterapia de la diabetes en la provincia de Chefchaouen, Marruecos." 44(1): 59.
85. Metformina. EcuRed. 2011. [en línea] <https://www.ecured.cu/Metformina>.
86. Moreno, L, Crespo, S, Pérez, WY. 2010. Pruebas bioquímicas como una herramienta para estudios en fisiología. Universidad nacional de Colombia. Bogotá.
87. Navarro, J, Mora, C, et al.2008. Fisiopatología de la nefropatía diabética, Vol. 1 No1. Pp 30.
88. Neuropatías diabéticas: el daño de los nervios NHI.2019. [en línea] <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/prevenir-problemas/neuropatias-diabeticas>
89. Novolin n suspensión inyectable. 2018. [en línea] https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-novolin+n+suspension+inyectable+100+ui%2Fml-mexico-a10ac01-mx_1.
90. Obi B Ch, Okoye TC, Okpashi VE, Igwe ChN, and Alumanah EO. 2016. Comparative Study of the Antioxidant Effects of Metformin, Glibenclamide, and Repaglinide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. Journal of Diabetes Research. Volume 2016, Article ID 1635361, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1635361>.
91. Onyeka CA, Nwakanma AA, BakareAA, et al. 2013. Hypoglycemic, antioxidant and hepatoprotective activities of ethanolic root bark extract of Chrysophyllum albidum in alloxaninduceddiabetic rat. Bangladesh Journal of Medical Science, 12(3): 298-304.
92. Orlandi, N. et al. 2012. Guías de prácticas clínicas. Diabetes mellitus tipo 2. La Habana: Ciencias médicas
93. Ortega, R. 2015. Metabolismo del Glutathion y enzimas antioxidantes frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en el ciliado-modelo "Tetrahymena thermophila Pp 63-68.
94. Orozco M. F. M. (2018). Efecto hipoglucemiante y antioxidante de la administración de Cuphea procumbens en un modelo de animales diabéticos. Tesis Maestría. UMSNH. 2018. Dirigida por DC Fenton NB.
95. Pérez, A. et al. 2014. Algunas consideraciones sobre la diabetes mellitus y su control en el nivel primario de salud. MEDISAN.
96. Pérez G, 2008. Glutathion. [en línea] <https://www.coenzima.com/glutatin>.
97. Pérez, G. 2003 Los flavonoides: antioxidante o prooxidantes, Rev. cubana Invest Biomed V.22. Ciudad de la habana. Pp 02.

98. PLM, líder en información sobre ciencias de la salud, [en línea] www.medicamentosplm.com/home/productos/novolin_r_solucion_inyectable/123/101/9009/162.
99. Ramos M. et al. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. Investigación en salud. VIII (1): 7-15.
100. Reyes, F A, Pérez, M L, et al. 2016. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo2, Vol. 20 No1.
101. Rivas, E, et al. 2011. Manejo practico del paciente con diabetes mellitus en la atención primaria de salud. Rev Finlay. 1(3).229-251
102. Salvarrita, N, et al. 2012. Tratamiento con antihiperglucemiantes orales: Clasificación, propiedades, combinaciones, indicaciones, contraindicaciones y cuentas adversas. Rev. Venezolana Endocrinal y meta, 10(1). 58-64
103. Sánchez, L.A. 2000. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales. Rev cubana farm. 34(1): 34-43.
104. Sánchez C. 2007. Cochayuyo, un alimento de excelencia nutricional. Scolarest.2 -4. 12.
105. Santos, NF, Salas, R, Villanueva, C and Hernández, CB. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In Antioxidants. Emad Shalaby Ed. IntechOpen 2019: 1-29.DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85270>.
106. Santa, N M, Zacarías, R. 2002. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus, Rev. Hosp Gral Dr. M Gea Gonzales. Pp 33-38.
107. Santa, N.M, Zacarias, R. 2002. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. Rev Hosp Gral Dr. M Gea González 2002;5(1-2):33-41.
108. Santander I.R. 2018. Cuantificación de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante en extractos de especies de Acacia (Acacia schaffneri, laevigata y aculeaticarpa). Tesis. UAEH. 2018. Dirigida por Manríquez J. J.
109. Satheesh, MA and Pari L. 2004. Antioxidant effect of Boerhavia diffusa L. in tissues of alloxan-induced diabetic rats. Indian Journal of Experimental Biology. 42(10):989-992.
110. Scheen A.J. 1996. Clinical pharmacokinetics of metformin. Clinical Pharmacokinetics 30(5): 359-371.
111. Sedlak J and Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Analytical Biochemistry, 25(1), 192-205.
112. Serna, L M, Pineda, N, et al. 2009. Nefropatía diabética, MEDICINA UPB 28(1) https://www.researchgate.net/publication/266339794_Nefropatia_diabetica_Diabetic_nephropathy. Artículo de revisión.
113. Shams Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Reza Oveisi M, Sadeghi N, Jannat B, Mohammad Ranjbar A, Gholam N y Moridi, T. 2011. Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (Punica granatum L.) Cultivars. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 10 (3): 519-524.

114. Simmons RA. 2006. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 40 (6): 917–922.
115. Tebar, F.J, Escobar F. 2009. La diabetes mellitus en la práctica clínica. Buenos Aires, Editorial medica panamericana.
116. Tirado, E. 2007. La Nopalinaza. *El Siglo de Torreón*. (Diario) Torreón, Coah.: 14.
117. Toledo, MD, Vega, L, et al. 2009. Pie diabético de la fisiopatología a la clínica, vol.1 No.3. Pp 63-64.
118. Unión Jalisco. 2019. Estadísticas de diabetes en México. [en línea]. <https://www.unionjalisco.mx/articulo/2019/11/12/salud/estadisticas-de-diabetes-en-mexico>
119. Velasco, B J, Berena, V M. 2014. Diabetes Mellitus Tipo 2 Epidemiología y Emergencia en salud Vol. .1 No2 Pp 11-14
120. Venéreo, J R. 2002. Daño oxidativo, Radicales libres y antioxidantes, *Rev cubana Med Milit*. Pp 128-129
121. Venéreo, J R. 2002. Daño oxidativo, Radicales libres y antioxidantes, *Rev cubana Med Milit*. Pp 130-131.
122. Villa, L, Nava, AA, et al. 1999. El estrés oxidativo ¿es necesario, medirlo en el paciente diabético? [en línea]. https://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/2000-136-3-249-256.pdf. Pp 256
123. Viña, J, Vento, M. 1999. Fisiología Básica de los Radicales Libres del Oxígeno. [en línea] <https://www.seneo.es/images/site/publicaciones/congresos/1999/fisiorad.pdf>
124. Wang, C.Y. 1994 Effect of temperatura precorditioning on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled zecchini squash. *Postharvest Biology and Technology*.
125. Zenteno, I E, Dañino, M C. et al. 2108 CECAM. [en línea]. <https://es.scribd.com/document/371338858/RETINOPATIA-DIABETICA>.
126. Zuluaga, A, Gaviria, D. 2012. una mirada al estrés oxidativo en la célula. *Revista médica de Risaralda* Vol.18 N.2 pp149.