

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

“Evaluación del efecto hipoglucemiante de la administración oral de extractos de hojas de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) en un modelo de animales hiperglucémicos sobre la variación de concentraciones de citocinas proinflamatorias”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

M A E S T R O EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

LICENCIADO EN NUTRICIÓN.

MANUEL ALEJANDRO VARGAS VARGAS.

DIRECTORA DE TESIS

D en C. BERTHA FENTON NAVARRO.

MORELIA MICHOACÁN, MÉXICO
JULIO 2016.



Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Glicobiología de la División de Estudios de Posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH, bajo la asesoría de la D en C. Bertha Fenton Navarro.

Apoyado por:

CONACyT

CIC-UMSNH. 2014-2015.

COMITÉ TUTORAL.

D en C. Sergio Gutiérrez Castellanos.

D en C. Martha Eva Viveros Sandoval.

DEDICATORIA.

A mi familia por el apoyo incondicional que recibo en todo momento, sin ustedes no lo hubiera logrado.

AGRADECIMIENTOS.

A mis amigos de la maestría: Armando, Andrés, Luis Miguel, Cristian, Liz y Nohemí, por los ratos agradables que me hicieron pasar dentro de mi estancia en este posgrado.

A mis compañeros de laboratorio: Meche, Brenda, Adrián, Anahí, Obed, Gerardo, Víctor, Carmen; de los cuales aprendí mucho y pase ratos muy agradables.

A mi asesora: Doctora Bertha Fenton Navarro, por haber sido mi guía en todo momento para la realización del presente trabajo y haberme enseñado el camino para ser mejor día a día.

| | |
|---|------|
| ÍNDICE GENERAL | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS | xii |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS | xiii |
| ABREVIATURAS | xv |
| GLOSARIO DE TÉRMINOS | xvii |
| RESUMEN | xx |
| ABSTRACT | xxi |
| | |
| I.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Diabetes | 1 |
| 1.1.1. Calificación de la diabetes | 1 |
| 1.1.2. Factores de riesgo para desarrollar diabetes | 4 |
| 1.2. Diabetes mellitus y estrés oxidativo | 4 |
| 1.2.1. Radicales libres | 8 |
| 1.2.2. Antioxidantes primarios y secundarios | 11 |
| 1.3. Enzimas antioxidantes | 12 |
| 1.3.1. Superóxido dismutasa | 12 |
| 1.3.2. Catalasa | 13 |
| 1.3.3. Glutación peroxidasa | 13 |
| | |
| MANUEL ALEJANDRO VARGAS VARGAS | v |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.4. Glutación reductasa | 14 |
| 1.3.5. Lipoperoxidación en tejidos como consecuencia del estrés oxidativo | 14 |
| 1.4. Inflamación y diabetes mellitus | 15 |
| 1.4.1. Citocinas proinflamatorias y su curso temporal | 16 |
| 1.4.2. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) | 17 |
| 1.4.3. Interleucina 1 (IL-1 β) | 20 |
| 1.4.4. Interleucina 6 (IL-6) | 21 |
| 1.5. Citocinas proinflamatorias y su contribución a la resistencia a la insulina | 22 |
| 1.6. Tratamiento farmacológico en la diabetes mellitus | 24 |
| 1.7. Tratamiento no farmacológico | 26 |
| 1.8. Plantas medicinales | 27 |
| 1.8.1. Compuestos activos de plantas | 29 |
| 1.8.2. Compuestos fenólicos y su biodisponibilidad | 30 |
| 1.8.3. Plantas con actividad antioxidante | 33 |
| 1.8.4. Plantas con actividad hipoglucemiante | 34 |
| 1.8.5. Plantas con actividad antiinflamatoria | 39 |
| 1.9. Capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 40 |
| II.- JUSTIFICACIÓN | 42 |

| | |
|---|----|
| III.- HIPOTESIS | 43 |
| IV.- OBJETIVO GENERAL | 44 |
| V.- OBJETIVOS PARTICULARES | 44 |
| VI.- MATERIALES | 44 |
| VII.- MÉTODOS | 45 |
| 7.1. Recolección e identificación de la capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 45 |
| 7.2. Obtención de diferentes extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 46 |
| 7.2.1. Obtención del extracto acuoso | 46 |
| 7.2.2. Obtención del extracto acetónico | 46 |
| 7.2.3. Obtención del extracto alcohólico | 46 |
| 7.2.4. Obtención de la fracción sin pigmentos | 47 |
| 7.3. Animales | 47 |
| 7.4. Inducción a la hiperglucemia | 47 |
| 7.5. Diseño experimental | 48 |
| 7.5.1. Administración aguda | 48 |
| 7.5.2. Administración crónica | 50 |
| 7.6. Estudios realizados a los extractos | 50 |
| 7.6.1. Método de Brand Williams (1,1-difenil-2-picrilhidrazil DPPH) | 50 |

| | |
|---|----|
| 7.6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos de extractos de capitaneja <i>(Verbessina montanoifolia)</i> . | 51 |
| 7.6.3. Cuantificación de Proteínas (Método de Bradford) | 52 |
| 7.6.4. Cuantificación de carbohidratos por el método de Benedict | 53 |
| 7.6.5. Cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois (Fenol-sulfúrico) | 53 |
| 7.6.6. Cuantificación de carbohidratos por el método de Fehling | 54 |
| 7.7. Medición de enzimas antioxidantes | 54 |
| 7.7.1. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa | 54 |
| 7.7.2. Determinación de la actividad de la catalasa | 55 |
| 7.7.3. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa | 55 |
| 7.7.4. Determinación de la actividad de la glutatión reductasa | 56 |
| 7.8. Cuantificación del grado de lipoperoxidación | 56 |
| 7.9. Medición del estado antioxidante total (TAS) | 56 |
| 7.10. Cuantificación de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) | 57 |
| 7.11. Análisis estadístico | 58 |
| VIII.- RESULTADOS | 59 |
| 8.1. Estandarización de la dosis hipoglucemiante óptima | 59 |
| 8.1.1. Extracto acuoso de capitaneja (<i>Verbessina montanoifolia</i>) | 59 |
| 8.1.2. Extracto acetónico de capitaneja (<i>Verbessina montanoifolia</i>) | 62 |

| | |
|--|----|
| 8.1.3. Extracto alcohólico de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 64 |
| 8.1.4. Fracción sin pigmentos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 66 |
| 8.2. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 69 |
| 8.2.1 Método de Brand Williams (1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)) | 69 |
| 8.2.2 Cuantificación de compuestos fenólicos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 71 |
| 8.3. Cuantificación de proteínas (Método de Bradford) | 74 |
| 8.4. Cuantificación de carbohidratos reductores | 74 |
| 8.4.1. Método de Benedict | 74 |
| 8.4.2. Método de Dubois (Fenol-sulfúrico) | 75 |
| 8.4.3. Método de Fehling | 75 |
| 8.4.4. Curva de glucosa en ayuno con extracto acuoso de capitaneja y glucosa | 76 |
| 8.5. Administración crónica | 77 |
| 8.5.1. Pesos de los animales durante la administración crónica | 77 |
| 8.5.2. Concentraciones de glucosa circulante en la administración crónica | 78 |
| 8.6. Determinación de la actividad enzimática | 80 |
| 8.6.1. Concentración de la superóxido dismutasa | 80 |
| 8.6.2. Concentración de la catalasa | 81 |
| 8.6.3. Concentración de la glutatión peroxidasa (GPx) | 83 |
| 8.6.4. Concentración de la glutatión reductasa (GR) | 85 |

| | |
|--|-----|
| 8.7. Grado de lipoperoxidación (Malondialdehído) | 86 |
| 8.8. Medición del estado antioxidante total (TAS) | 88 |
| 8.9. Cuantificación de citocinas proinflamatorias (TNF α -, IL-1 β e IL-6). | 89 |
| IX.- DISCUSIÓN | 93 |
| X. CONCLUSIONES | 108 |
| XI.- PERSPECTIVAS | 109 |
| XII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 110 |
| XIII.- ANEXOS | 125 |
| 13.1. Recolección de la capitaneja en el cerro del águila Michoacán, México. | 125 |
| 13.2. Identificación científica de la capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>). | 126 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.- Participación del estrés oxidativo en la diabetes mellitus | 7 |
| Figura 2.- Acciones biológicas del factor de necrosis tumoral α | 19 |
| Figura 3.- Acciones biológicas de la interleucina 1 β | 21 |
| Figura 4.- Acciones biológicas de la interleucina 6 | 22 |
| Figura 5.- Rutas de síntesis de metabolitos secundarios | 30 |
| Figura 6.- Acciones biológicas de los polifenoles en el cuerpo humano | 31 |
| Figura 7.- Principales sitios de acción de los polifenoles de la dieta sobre el metabolismo de los carbohidratos y de la homeostasis de la glucosa. | 38 |
| Figura 8.- Ubicación geográfica del cerro del Águila. | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1.- Clasificación de los antioxidantes | 11 |
| Tabla 2.- Fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes | 25 |
| Tabla 3.- Plantas con efecto modulador de citocinas pro inflamatorias | 39 |
| Tabla 4.- Tabla de efectividad hipoglucemiante de diferentes extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 69 |
| Tabla 5.- Capacidad antioxidante de diferentes extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) y del ácido ascórbico. | 70 |
| Tabla 6.- Cuantificación de fenoles en diferentes extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 71 |
| Tabla 7.- Cuantificación de polifenoles en diferentes extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 72 |
| Tabla 8.- Cuantificación de flavonoides en diferentes extractos de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 73 |
| Tabla 9.- Concentración de proteína del extracto acuoso de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) | 74 |
| Tabla 10.- Concentración de carbohidratos reductores en la capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) por el método de Benedict | 75 |
| Tabla 11.- Concentración de hexosas y pentosas en la capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) por el método de Dubois. | 75 |
| Tabla 12. Concentración de carbohidratos reductores en la capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>) por el método de Felhing. | 76 |
| Tabla 13.- Peso de los animales durante la administración crónica. | 77 |
| Tabla 14.- Concentraciones circulantes de glucosa durante la administración crónica. | 79 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| Gráfica 1.- Distribución de las plantas con efecto antidiabético por familia botánica y sus porcentajes de acuerdo al número de especies empleadas | 36 |
| Gráfica 2.- Curva de glucosa en ayuno con diferentes dosis de extracto acuoso de capitaneja (EAC) en ratas hiperglucémicas. | 60 |
| Gráfica 3.- Curva de tolerancia a la glucosa con diferentes dosis de extracto acuoso de capitaneja (EAC) en ratas hiperglucémicas. | 61 |
| Gráfica 4.- Curva de tolerancia a la glucosa comparando el efecto del extracto acuoso de capitaneja (EAC) fresco y seco en ratas hiperglucémicas. | 62 |
| Gráfica 5.- Curva de glucosa en ayuno de diferentes dosis de extracto acetónico de capitaneja (EACC) en ratas hiperglucémicas. | 63 |
| Gráfica 6.- Curva de tolerancia a la glucosa de diferentes dosis de extracto acetónico de capitaneja (EACC) en ratas hiperglucémicas. | 64 |
| Gráfica 7.- Curva de glucosa en ayuno de diferentes dosis de extracto alcohólico de capitaneja (EOHC) en ratas hiperglucémicas. | 65 |
| Gráfica 8.- Curva de tolerancia a la glucosa de diferentes dosis de extracto alcohólico de capitaneja (EOHC) en ratas hiperglucémicas. | 66 |
| Gráfica 9.- Curva de glucosa en ayuno de diferentes dosis de la fracción sin pigmentos (FSP) en ratas hiperglucémicas. | 67 |
| Gráfica 10.- Curva de tolerancia a la glucosa de diferentes dosis de la fracción sin pigmentos (FSP) en ratas hiperglucémicas. | 68 |
| Gráfica 11.- Cinética antioxidante del ácido ascórbico, extracto crudo de capitaneja, y los extractos alcohólico y acetónico de capitaneja (<i>Verbesina montanoifolia</i>). | 70 |
| Gráfica 12.- Curva patrón para la cuantificación de fenoles utilizando ácido gálico | 72 |
| Gráfica 13.- Curva patrón para la cuantificación de polifenoles utilizando fluoroglucinol | 73 |

| | |
|--|----|
| Gráfica 14.- Curva patrón para la cuantificación de flavonoides utilizando quercetina | 74 |
| Gráfica 15.- Curva de glucosa en ayuno comparando la dosis de 200 mg/kg y su equivalente de glucosa | 76 |
| Gráfica 16.- Pesos de los animales durante la administración crónica | 78 |
| Gráfica 17.- Concentraciones de glucosa circulante en la administración crónica | 79 |
| Gráfica 18.- Concentración de superóxido dismutasa en la administración crónica | 81 |
| Gráfica 19.- Concentración de catalasa en páncreas durante la administración crónica. | 82 |
| Gráfica 20.- Concentración de catalasa en hígado durante la administración crónica. | 83 |
| Gráfica 21.- Concentración de catalasa en riñón durante la administración crónica | 84 |
| Gráfica 22.- Concentración de glutatión peroxidasa durante la administración crónica | 85 |
| Gráfica 23.- Concentración de la glutatión reductasa durante la administración crónica | 86 |
| Gráfica 24.- Cuantificación de lipoperoxidación en páncreas en la administración crónica. | 87 |
| Gráfica 25.- Cuantificación de lipoperoxidación en hígado en la administración crónica. | 88 |
| Gráfica 26.- Cuantificación de lipoperoxidación en riñón en la administración crónica. | 89 |
| Gráfica 27.- Cuantificación del estado antioxidante total en la administración crónica | 90 |
| Gráfica 28.- Concentración de TNF- α circulante en la administración crónica | 91 |
| Gráfica 29.- Concentración de IL-1 β circulante en la administración crónica | 92 |

Grafica 30.- Concentración de IL-6 circulante en la administración crónica

93

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AGEs | Productos finales de glicación avanzada |
| CAT | Catalasa |
| DM | Diabetes Mellitus |
| DL | Decilitros |
| EAC | Extracto acuoso de capitaneja |
| EACC | Extracto acetónico de capitaneja |
| Esc-SOD | Superóxido dismutasa extracelular |
| EOHC | Extracto alcohólico de capitaneja |
| FSP | Fracción sin pigmentos |
| Gpx | Glutación peroxidasa |
| GR | Glutación reductasa |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogeno |
| HB | Hemoglobina |
| ICAM | Moléculas de adhesión intercelular |
| IFN-γ | Interferon gamma |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| kDA | Kilodaltons |
| Kg | Kilogramo |
| LSP | Lipopolisacarido |
| L | Litro |
| Mg | Miligramos |
| MDA | Malondialdehído |
| MI | Mililitros |

| | |
|-----------------------|--|
| μL | Microlitro |
| mM | Milimolar |
| Min | Minuto |
| Mn-SOD | Superóxido dismutasa mitocondrial |
| Nm | Nanómetro |
| NADP | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida |
| NK | Natural Killer o linfocito asesino natural |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B |
| O₂- | Singlete de oxígeno |
| •OH | Radical hidroxilo |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| pH | Potencial de Hidrogeno |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TNF-β | Factor de necrosis tumoral β |
| TBARS | Ácido tiobarbiturico |
| USD | Dólares americanos |
| UI | Unidades Internacionales |
| VCAM | Moléculas de adhesión vascular |
| Zn/Cu-SOD | Superóxido dismutasa citoplasmática |

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alcaloides son metabolitos secundarios de vegetales que se sintetizan mediante aminoácidos. Un alcaloide, por lo tanto, es un compuesto químico que cuenta con nitrógeno que proviene del proceso metabólico de un aminoácido. Cuando su origen es otro, se habla de pseudoalcaloides.

Alzheimer Enfermedad mental progresiva que se caracteriza por una degeneración de las células nerviosas del cerebro y una disminución de la masa cerebral; las manifestaciones básicas son la pérdida de memoria, la desorientación temporal y espacial y el deterioro intelectual y personal.

Antioxidante: sustancia que presente en bajas concentraciones en relación a un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de tal sustrato.

Antocianinas son compuestos que se encuentran en las plantas, especialmente las bayas, que tienen propiedades antioxidantes de gran alcance. Se proporcionan algunos de los colorantes o pigmentos de plantas, flores y frutos.

Biodisponibilidad se expresa frecuentemente como la proporción de la dosis ingerida que es excretada en orina comparada con la excretada en heces. Sin embargo, los compuestos liposolubles, no serán directamente excretados en orina sino que aparecerán como metabolitos hidrosolubles.

Diabetes mellitus Enfermedad que define a un grupo de alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por hiperglucemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambas.

Especie reactiva de oxígeno Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno.

Estrés oxidativo es un desequilibrio bioquímico entre los radicales libres (especies reactivas) y los antioxidantes en favor de los primeros lo que propicia daño celular y tisular al organismo.

Flavonoides son pigmentos vegetales con un marcado poder antioxidante, que previenen el envejecimiento celular y los procesos degenerativos.

Fungicidas compuesto químico que destruye los hongos parásitos.

Herbicidas es un producto fitosanitario utilizado para eliminar plantas indeseadas. Algunos actúan interfiriendo con el crecimiento de las malas hierbas y se basan frecuentemente en las hormonas de las plantas.

Hipertensión Es la elevación de los niveles de presión arterial de forma continua o sostenida. Para entenderlo mejor es importante definir la presión arterial.

Insulina Hormona producida por el páncreas, que se encarga de regular la cantidad de glucosa de la sangre.

Polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados.

Resistencia a la insulina es una condición que ocurre cuando el cuerpo no responde a la insulina que produce. El resultado es que glucosa no puede entrar

las células y se queda en la sangre. Con el tiempo, el nivel de glucosa en la sangre se acumula y el resultado es diabetes.

Radical libre son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células, produciendo la oxidación de sus partes, alteraciones en el ADN, y que provocan cambios que aceleran el envejecimiento del cuerpo.

Xenobioticos Es un compuesto ajeno al cuerpo. Las principales clases de xenobióticos de importancia médica son los fármacos, carcinógenos químicos y varios compuestos que han llegado a nuestro ambiente de una u otra manera, como bifenilos policlorinados (PCB) y ciertos insecticidas.

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad que involucra una serie de trastornos metabólicos. El proceso inflamatorio crónico que ocurre en esta enfermedad propicia la secreción de citocinas proinflamatorias: $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$, que favorece un aumento en el estrés oxidativo. Los fármacos utilizados generan efectos secundarios adversos. Las plantas medicinales poseen menos efectos secundarios y contienen principios activos los cuales poseen actividad hipoglucemiante y antioxidante y se espera que estos compuestos tengan un efecto antiinflamatorio. **Objetivo:** Evaluar las variaciones de concentraciones circulantes de citocinas proinflamatorias ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$) en ratas hiperglucémicas tratadas con administración oral de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*). **Metodología.** Evaluación de actividad hipoglucemiante aguda mediante curvas de ayuno y tolerancia a la glucosa. Se dividieron los animales en 4 grupos de 6 animales cada uno. 1) Sanas + solución salina 2) Hiperglucémicas + Insulina 3) Hiperglucémicas + extracto acuoso de capitaneja 4) Sanas + Extracto acuoso de capitaneja. Todos los grupos con una administración oral diaria por 60 días posteriormente se medirán enzimas antioxidantes y citocinas circulantes la cual se realizó través del método de ELISA tipo sándwich. **Resultados:** Mediante un análisis *in vitro* la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee actividad hipoglucemiante, antioxidante, contiene polifenoles, fenoles y flavonoides así como carbohidratos (36.04 mg/mL) y proteínas (0.92 mg/mL). Antes la comprobación que tiene actividad hipoglucemiante. Durante la administración crónica logró mantener una ganancia de peso a los animales, protegió a las diferentes enzimas antioxidantes y disminuyendo el grado de lipoperoxidación en diversos tejidos. El $TNF-\alpha$ disminuyó a partir de la semana 2 en donde sus niveles se mantuvieron por debajo de los 500 pg/mL, en cuanto a la $IL-1\beta$ logró una completa inhibición durante todo el periodo experimental y por último los niveles de $IL-6$ siempre se mantuvieron en niveles normales sin ninguna diferencia significativa al compararlos con los controles **Conclusiones:** La capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee efecto hipoglucemiante, antioxidante, mejora el estrés oxidativo. La administración crónica del extracto acuoso de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee un efecto antiinflamatorio ($IL-1\beta$, $IL-6$ y $TNF\alpha$).

Palabras clave: Diabetes Mellitus, Capitaneja, *Verbesina montanoifolia*, Citocinas proinflamatorias, polifenoles.

ABSTRACT

Introduction. Diabetes mellitus is a disease that involves a series of metabolic disorders. Chronic inflammation promotes the secretion of various pro inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF α) and increase the oxidative stress. Pharmacological therapy used generate adverse side effects. Medicinal plants have less adverse side effects and possess active compounds which have hypoglycemic and antioxidant activity, and this compounds are expected to have anti-inflammatory activity as well. **Objective.** To measure changes in circulating levels of pro inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF α) in hyperglycemic rats treated with oral administration of capitaneja (*Verbesina montanoifolia*). **Methodology.** Evaluation of acute hypoglycemic activity was measure through fasting and glucose tolerance. The animals were divided into 4 groups of 6 animals each. 1) Healthy rats + saline solution 2) Hyperglycemic rats + Insulin 3) Hyperglycemic rats + Capitaneja aqueous extract 4) Healthy rats + Capitaneja aqueous extract. All groups with a daily oral administration for 60 days. Thereafter circulating cytokines were measured by sandwich ELISA. **Results.** The analysis of the aqueous extract and pigments from Capitaneja showed it has hypoglycemic and antioxidant activity, with higher polyphenols, phenols and flavonoids as the controls used. Also it has reducing carbohydrates (36.04 mg/mL) and proteins (0.92 mg/mL). During chronic administration, a weight gain was observed in all groups. Protects different antioxidant enzymes and decreasing the lipid peroxidation in various tissues. TNF- α decreases from week 2 wherein levels remain below 500 pg/mL, IL-1 β achived complete inhibition throughout the experimental period , and finally the levels of IL-6 always remained at normal levels without any significant difference when compared with controls **Conclusion.** The capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) has hypoglycemic and antioxidant effect, and also decreases oxidative stress. Chronic administration of the aqueous extract of capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) has antiinflammatory effect.

Key words: Diabetes mellitus, Capitaneja, *Verbesina montanoifolia*, proinflammatory cytokines, polyphenols.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes

El término diabetes mellitus define alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por hiperglucemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambas (ADA, 2013).

El control adecuado de la hiperglucemia en la diabetes se asocia con la prevención del daño a largo plazo ocasionando complicaciones micro y macro vasculares, arterioesclerosis, retinopatía, nefropatía, neuropatía, pie diabético entre otras complicaciones (Rodríguez JL y Del Rio M, 2014), sin embargo, para lograr un control estricto se requiere una estrategia de cuidado estructurado-(Renders CM y cols 2001).

En México, en la población adulta (20 a 69 años) se calcula que hay más de 17 millones de pacientes con hipertensión, más de 14 millones con dislipidemia, más de seis millones con diabetes mellitus tipo 2, más de 35 millones de adultos con sobrepeso u obesidad y más de 15 millones de individuos con grados variables de tabaquismo (Lozada ALT y cols. 2011).

1.1.1. Clasificación de la diabetes

La clasificación de la diabetes incluye cuatro tipos diferentes de diabetes:

- ✓ Diabetes tipo 1: enfermedad autoinmune que produce como resultado la destrucción de las células beta del páncreas, por lo general conduce al déficit absoluto de insulina.
- ✓ Diabetes tipo 2: resultado de un progresivo déficit de secreción de insulina o bien como resultado del desarrollo de una resistencia a la insulina.

- ✓ Diabetes mellitus gestacional: diabetes diagnosticada durante el embarazo por lo que no es claramente una diabetes.
- ✓ Otros tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, defectos genéticos en la función de las células beta, defectos genéticos en la acción de la insulina, las enfermedades del páncreas exocrino (por ejemplo, fibrosis quística), y las inducidas por drogas o por productos químicos (ADA, 2015).

La Diabetes Mellitus tipo 2 es la más común afectando a un 90% de total de los casos de la población diabética del mundo y existe un acelerado aumento de nuevos casos en zonas urbanas y rurales (ADA, 2015)

En el año 2008 se reportó que:

- ✓ Más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos y medios.
- ✓ Casi la mitad de esas muertes corresponden a personas de menos de 70 años.
- ✓ La alimentación saludable, la actividad física regular, el mantenimiento de un peso corporal normal y evitar el consumo de tabaco pueden prevenir la diabetes de tipo 2 o retrasar su aparición (Reducing risk and preventing disease, 2011).

Mientras que en América Latina hay más de 25 millones de diabéticos, y para 2030 podrían ser 40 millones, en América del Norte y los países anglófonos del Caribe este número podría elevarse de 38 a 51 millones en ese mismo lapso. (La salud, nuevos retos y padecimientos. 2015).

A su vez en el año 2012, la Federación Internacional de la Diabetes estimó que más de 371 millones de personas vivían con dicha enfermedad y que 4.8 millones de personas mueren a causa de la misma. Por otro lado a nivel mundial se estima que para el año 2030 el número de personas diabéticas se incremente a 439 millones, lo que representa el 7.7% de la población adulta (de 20 a 79 años de edad) del mundo (Boletín epidemiológico diabetes mellitus tipo 2 primer trimestre, SINAVE, 2013).

En México, la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales y al igual que otros países, México enfrenta problemas diversos que limitan la eficacia de los programas institucionales para la contención de esta enfermedad. Destacan por su importancia el insuficiente abasto de medicamentos, equipo inadecuado y obsoleto en las unidades de salud, la inaccesibilidad a exámenes de laboratorio, limitaciones de los servicios de apoyo psicológico, nutricional, nula promoción de actividad física, auto monitoreo y escasa supervisión de los servicios para alcanzar la adherencia terapéutica (NOM 0-15, 2010).

En el año 2012 se identificaron a 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. El total de personas adultas con diabetes podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición (ENSANUT, 2012).

En el mundo, los gastos sanitarios por diabetes se han elevado a 465.000 millones de USD en 2011, lo cual equivale al 11% del gasto sanitario total. Si no se invierte en hacer que los tratamientos eficaces para prevenir las complicaciones diabéticas estén al alcance de todos, se predice que esta cifra aumentará hasta los 595.000 millones de USD para 2030 (Federación Internacional de Diabetes, 2011).

Respecto a los costos al bolsillo de los usuarios, de cada 100 pesos que se gastan en diabetes en México, aproximadamente 51 pesos proviene de los hogares/ingresos familiares, representa una carga social de muy alto impacto que evidentemente tendrá un efecto considerable en la medición del gasto catastrófico en salud del país, sobretodo tratándose de un padecimiento de alto costo y alta prioridad como problema de salud pública en México (Arredondo A, De Icaza E, 2011).

1.1.2. Factores de riesgo para desarrollar diabetes

Existen factores de riesgo para cada tipo de diabetes. Existen factores de riesgo no modificables, como la edad, la historia familiar, haber presentado diabetes gestacional, o la raza; sin embargo, hay algunos hábitos de vida que pueden elevar el riesgo a desarrollar diabetes como el sedentarismo, malos hábitos alimenticios, el sobrepeso o la obesidad abdominal, los cuales son factores de riesgo modificables (Guía ¿Conoces tu riesgo de desarrollar diabetes en el adulto? 2013).

1.2. Diabetes mellitus y estrés oxidativo

Se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de las complicaciones en la diabetes (Ullah A y cols. 2015), este es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros con implicaciones en la homeostasis del organismo por daño a nivel celular, tisular y sistémico (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez 2007).

El incremento en especies reactivas de oxígeno puede deberse a la disminución en la destrucción o al aumento en la producción por la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). La variación en los niveles de estas enzimas hace que los tejidos más susceptibles al daño por estrés oxidativo (Ullah A y cols. 2015).

El daño celular que producen el estrés oxidativo, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros (Ramos IML y cols. 2006).

Se ha precisado además, que el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y los antioxidantes es un elemento patogénico importante de la resistencia a la insulina ya que una de las proteínas que puede sufrir daño oxidativo en los diabéticos es la insulina, lo cual provoca cambios químicos y estructurales en esta hormona y, como consecuencia, una pérdida de su función biológica (Cruz HJ y cols. 2011).

La hiperglucemia da como resultado una excesiva producción de Acetil CoA el cual entra al ciclo de Krebs, produciendo un exceso de NADH, por lo tanto la cadena transportadora de electrones se encuentra bajo una fuerte presión. De esta manera, la oxidación de la sobreproducción del NADH por la mitocondria va a conducir inevitablemente a la producción de más peróxido por ende especies reactivas de oxígeno, lo cual eleva la magnitud del estrés oxidativo (Liang-Jun, 2014), además, dado que las mitocondrias de las células juegan un papel central en la secreción de insulina en el páncreas, estimulada por glucosa, el daño a nivel mitocondrial puede contribuir a la atenuación de esta respuesta. Por lo tanto, la generación de especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo pueden contribuir a la aparición, progresión y complicaciones de la diabetes tipo 1 y 2 (Danay HR y cols. 2014).

Existen varios mecanismos implicados en el incremento de las especies reactivas de oxígeno en la Diabetes mellitus, entre los que se encuentran:

- La vía del poliol o sorbitol: Es una cascada de reacciones químicas en la cual se obtiene fructosa a partir de la glucosa, pasando por el sorbitol con la ayuda de la enzima aldosa reductasa. El incremento de esta vía trae aparejado cambios severos que incluye la disminución en los niveles de NADPH, Glutación y miositol; cada uno con un papel importante en el desarrollo de la microangiopatía diabética (Triana M. 2001).
- Glicación no enzimática de proteínas: Este proceso implica una reacción en la cual los azúcares reaccionan no-enzimáticamente con las proteínas para formar los productos de glicación precoz llamados de Amadori posteriormente una serie compleja de reordenamientos intramoleculares y reacciones oxidativas conduce a la formación de compuestos múltiples, muy reactivos, colectivamente conocidos como productos de glicación avanzada (AGEs), estos son capaces de producir agregación de proteínas y se ha demostrado que exhiben diversas actividades biológicas deletéreas; Los AGEs contribuyen a la coloración marrón, al aumento en la fluorescencia y a la escasa solubilidad de las cristalinas así como a la agregación y a la disminución graduales de la elasticidad del colágeno tisular, cambios típicos que ocurren en el envejecimiento (Gugliucci A 2000).
- Auto oxidación de la glucosa: Esta ruta es muy importante en el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones ya que genera peróxidos de hidrogeno (H_2O_2) que en presencia de ciertos metales pueden formar el radical hidroxilo el cual ataca al DNA provocando alteraciones muta génicas (Robertson P 2004).

La cadena transportadora de electrones: Es considerada la mayor fuente de formación de radicales libres. Del total del oxígeno que llega a la mitocondria, del 5 al 10% se reduce por la acción de los electrones procedentes de los transportadores de la cadena respiratoria que escapan de ésta, la cual es responsable de la formación del anión O_2^- , que por acción de la enzima súper óxido dismutasa se convierte en H_2O_2 y éste a $\bullet OH$ mediante la reacción de Fenton (Maldonado S y cols. 2010; Rodríguez C y Céspedes M 1999).



Figura 1.- Participación del estrés oxidativo en la *diabetes mellitus* (Villa-Caballero y cols. 1999).

1.2.1. Radicales libres

Químicamente, un radical libre se define como un átomo o molécula que en su último orbital presenta un electrón no apareado, por lo cual es una especie altamente inestable y reactiva que precisa de obtener el átomo que le falta de las moléculas vecinas, y dependiendo de dónde y cuánto se genere puede estabilizarse tomando el electrón que requiere de las biomoléculas próximas a él (Valko M y cols. 2006).

Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos. Como producto del metabolismo se generan distintos tipos de radicales libres, tales como: especies reactivas de oxígeno (el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo) y especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico, radical peroxinitrito), entre otros, cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, citoplásmica y del retículo endoplásmico (Maldonado S y cols, 2010).

Los radicales libres también son generados por factores como: la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas (Ortiz-García y Morales-Vázquez, 2013).

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) que es generado siempre que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entra en contacto con iones

cobre (Cu^{+2}) o iones hierro (Fe^{+2}); ya que el H_2O_2 y los complejos metálicos están presentes en humanos.

Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

- Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
- Pérdida de un protón de una molécula.
- Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones a la concentración normal llega a ser tóxico, esta toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las especies reactivas de oxígeno. Así, la presencia de las especies reactivas de oxígeno ha sido asociada al proceso de envejecimiento y a una amplia diversidad de estados patológicos como la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, la hipertensión y la carcinogénesis, entre otros (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri 2006).

Este grado de oxidación molecular definido como estrés oxidativo depende del nivel de las especies reactivas de oxígeno ya que el flujo neto de radicales libres representa el nivel de estrés oxidativo, causante de la modificación química de moléculas biológicas. El daño resultante puede afectar las funciones celulares y de tejidos dando lugar a diferentes patologías (Balderas F y Méndez J 1998).

Es importante mencionar que los radicales libres existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, y los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados del hidrogeno y del carbono, así como los

formados por metales de transición como el hierro y el cobre entre otros (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

El oxígeno (O_2) contenido en el aire que normalmente respiramos es fundamental para la vida, sin embargo muchas reacciones en las que participa el O_2 originan radicales libres, de ahí que el oxígeno sea una molécula potencialmente tóxica. La reducción univalente de O_2 genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucra cuatro electrones, produciendo 3 compuestos denominados especies reactivas de oxígeno:

- 1.-El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)
- 2.-Peroxido de Hidrógeno (H_2O_2)
- 3.-Radical Hidroxilo (OH^{\cdot}) (Sánchez Rodríguez y cols. 2004).

El producto final de la cadena de reacciones, puede ser la molécula de agua, en cuyo caso hay menores posibilidades de daño al organismo; sin embargo considerando que este es un sistema dinámico, es probable que se den otras interacciones bioquímicas que conduzcan a la generación y acumulación de radicales libres. Condiciones como la presencia de iones metálicos reductores, compuestos derivados de nitrógeno o deficiencia en los donadores de electrones necesarios para remover o estabilizar a los radicales libres puede causar un exceso de éstos (Mc Cord, 2000).

Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con diferentes materiales celulares pueden ser muy variadas. Los objetivos celulares frecuentemente atacados son: el ADN, los lípidos membranales, así como proteínas y carbohidratos. A nivel de organelos, se ha observado que las mitocondrias son sumamente sensibles a la presión oxidativa, lo que se refleja en cantidades elevadas de oxidación en lípidos y proteínas, y en mutaciones del ADN mitocondrial (González-Torres MC y cols. 2000).

Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno se producen en diversos tejidos bajo condiciones diabéticas, alguna de las fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno en células son: La reacción de glicación no enzimática (AGEs), la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y la producción de NADH oxidasa (Kaneto y cols. 2009).

Químicamente el estrés oxidativo está asociado con un aumento en la producción de especies oxidantes y una disminución de la efectividad de los sistemas de defensa antioxidantes como el glutatión (Kumawat y cols. 2013).

1.2.2. Antioxidantes primarios y secundarios

Un antioxidante se define como aquella sustancia que presente en bajas concentraciones en relación a un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de tal sustrato (Halliwell B y Gutteridge J 1995). Los antioxidantes utilizan varios mecanismos de acción y con base en esto se han clasificado en primarios y secundarios (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez, 2007).

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez 2007).

| Antioxidantes primarios | | Antioxidantes secundarios |
|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Enzimas | Proteínas | |
| Superóxido dismutasa (SOD) | Transferrina | Vitamina C |
| Glutatión peroxidasa (GPx) | Ceruloplasmina | Vitamina E |
| Catalasa (CAT) | Albúmina | Vitamina A y carotenos |
| | Metalotioneínas | Ácido úrico |
| | | Bilirrubinas |
| | | Albúmina |
| | | Melatonina |
| | | Estrógenos |

El antioxidante al colisionar con el radical libre cede un electrón, se debilita su acción y en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva con la ayuda de otros antioxidantes (Bacallao, 2011). Los productos finales de esta reacción de disipación energética antioxidante-oxidante son comúnmente el O₂ y el H₂O, acompañados de liberación de calor (Gómez Pérez, 2013).

1.3. Enzimas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes se pueden diferenciar en primarios constituidos por enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa, así como otras del ciclo redox del glutatión), estas enzimas poseen capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres y son dependientes de ciertos cofactores generalmente oligoelementos metálicos tales como cobre, hierro, magnesio, zinc o selenio.

Los mecanismos de acción de las distintas defensas antioxidantes las podemos centrar en tres campos: mecanismos de prevención (sistemas primarios), mecanismos eliminadores de radicales libres y sistemas enzimáticos de reparación o síntesis *de novo* (Galván C y cols. 2008).

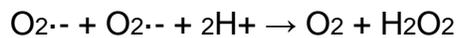
1.3.1. Superóxido dismutasa

Es un grupo de metaloproteínas, caracterizadas por la presencia de manganeso en las mitocondrias o de zinc/cobre en el citosol.

La familia de las SOD ha ido en aumento y ya se han descubierto al menos tres miembros además de las dos proteínas inicialmente detectadas (la Mn-SOD mitocondrial y la Zn/Cu-SOD citoplasmática, que dan cuenta del 100% de la actividad SOD intracelular), la Esc-SOD es de localización extracelular.

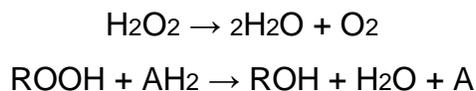
La distribución de la SOD es muy amplia a nivel tisular, con excepción de la Mn-SOD, que no se localiza a nivel eritrocitario; todas ellas ejercen un importante papel en el control de los niveles de radical superóxido a nivel celular (Galván C y cols. 2008).

Esta enzima cataliza la dismutación de la especie reactiva de oxígeno anión superóxido a O₂ y a una especie menos reactiva, el peróxido de hidrogeno, este peróxido puede ser destruido por la enzima catalasa o la glutatión peroxidasa (Krishnamurthy P y Wadhvani A, 2012).



1.3.2. Catalasa

La catalasa es una enzima tetramérica que consta de 4 subunidades tetraédricas de 60 kDa, tiene un peso molecular de 240 kDa. La catalasa reacciona de manera muy eficiente con el H₂O₂ para formar agua y oxígeno molecular, y con donadores de hidrogeno como metanol, etanol o fenoles con actividad de peroxidasa (Matés JM y cols. 1999).



1.3.3. Glutatión peroxidasa

Las enzimas Glutatión peroxidasa es una metaloenzima, lo que significa que dependen de la presencia de minerales como selenio (Se), cobre (Cu), zinc (Zn) y manganeso (Mn), que actúan como catalizadores para su síntesis (Villa N y cols. 2008), cataliza la reducción de H₂O₂ y también la reducción de lipoperóxido (L-OOH), utilizando al glutatión (GSH) como agente reductor. Glutatión peroxidasa es el nombre genérico de un grupo de isoenzimas que poseen una triada catalítica

compuesta de selenocisteína, glutamina y triptófano; se conocen cuatro enzimas mayoritarias en los tejidos de los mamíferos todas dependientes de Selenio: GPX citosólica (GPX1), GPX gastrointestinal (GPX2), GPX plasmática (GPX3) y GPX de fosfolípidos (GPX4). El centro activo se encuentra en el átomo de Se unido covalentemente a un residuo de cisteína; entre las diferentes formas de GPX se conserva casi intacta esta estructura del centro catalítico. La capacidad reductora de las enzimas GPX se basa en altas concentraciones de glutatión reducido (GSH); un tripéptido celular con un grupo sulfhidrilo, con capacidad antioxidante. Durante el mecanismo catalítico de GPX un selenol reacciona con un peróxido para dar ácido selénico, aquí es donde se une el primer GSH formando agua y una proteína Se-SG, se enlaza un segundo GSH produciendo una proteína Se-GH más un H⁺ y un GSSG. Reacción peroxidativa de la catalasa, en esta reacción utiliza como donadores de hidrógeno al metanol o al formaldehído para la producción de dos moléculas de agua metabólica. El GSSG formado durante la reacción es reducido por la enzima glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor (Krishnamurthy P y Wadhvani A, 2012).



1.3.4. Glutatión reductasa

La glutatión reductasa es la enzima encargada de transferir electrones del NADPH al glutatión oxidado (GSSG) reduciendo así esta molécula. Durante las reacciones catalizadas por la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa el glutatión no es consumido, pero es reciclado y así puede de nuevo ser utilizado cuando se requiera (Martínez-Sámano y cols. 2011).

1.3.5. Lipoperoxidación en tejidos como consecuencia del aumento en el estrés oxidativo

Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando Malondialdehído (MDA), de tal manera que la concentración sérica de MDA, es proporcional a los

ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de peroxidación lipídica (Yoshida Y y cols. 2013).

1.4. Inflamación y diabetes mellitus

La inflamación es una respuesta del organismo ante la exposición a agentes infecciosos, estímulos antigénicos o lesiones físicas que involucra a células del sistema inmunológico como neutrófilos, basófilos, células T entre otras. Inicialmente tiene una función homeostática de protección o defensa que se caracteriza por rubor, dolor, tumefacción, edema y falta de función en la zona afectada, no obstante si el proceso es ineficiente y se vuelve crónico, se transforma en un proceso fisiopatológico que favorece el incremento de radicales libres y consecuentemente estrés oxidativo (Punchard N y cols, 2004).

Durante el proceso inflamatorio participan elementos celulares como humorales, también actúan las células endoteliales del tejido dañado o próximo a la lesión, así como las células efectoras de la respuesta inmune como los leucocitos cuya actividad es coordinada y regulada por citocinas y por otros mediadores que pueden ser liberados por células de los sistemas inmunitarios innato y adquirido, o bien producidas por los sistemas enzimáticos plasmáticos entre los que están el sistema de la cinina, el de la coagulación, el fibrinolítico y el del complemento.

El mecanismo es complejo e implica una sucesión de eventos en el que participan los elementos ya mencionados, coordinados y dirigidos a controlar o reparar el daño (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez 2007).

Se han acumulado evidencias que subrayan la relevancia del factor nuclear kappa (NF- κ B) como común denominador en la expresión coordinada de los genes

inducidos por procesos inflamatorios en la activación endotelial, a diferencia de otros factores de transcripción, la activación del NF- κ B no requiere la inducción de su expresión ya que este factor se encuentra en forma de heterodímero inactivo en

el citoplasma unido a proteínas inhibidoras denominadas genéricamente I κ B. El heterodímero típico de NF- κ B consiste en una subunidad p50 y otra p65. Cuando la célula es estimulada por alguno de los agentes mencionados anteriormente I κ β se

fosforila y experimenta ubiquitinación, lo que sirve de señal para la degradación proteolítica. Entonces el dímero p50/p65 se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes diana que poseen en su promotor elementos de respuesta κ B. Entre los numerosos genes regulados por NF- κ B se encuentran citocinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL6 e IL-8), factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos, MCP-1, Factor tisular, varias moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) (Badimon L y Martínez-González, 2006).

El factor de transcripción NF- κ B controla la expresión de gran número de genes implicados en la inflamación y la proliferación, su activación incluye una serie de diferentes estímulos incluyendo citocinas proinflamatorias, intermediarios de las especies reactivas de oxígeno y ciertos microorganismos (Brand K y cols 1996).

1.4.1. Citocinas proinflamatorias y su curso temporal

Son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Aunque en general están producidas por leucocitos,

determinadas citocinas pueden también ser secretadas por otros muchos tipos celulares (Navajas LF y Cano MF 2011).

La mayoría de las citocinas actúan cerca del lugar donde son producidas, bien en la misma célula que la secreta (acción autócrina), bien en una célula próxima (acción parácrina). Cuando se producen en grandes cantidades, las citocinas pueden entrar a la circulación y actuar a distancia del sitio de producción (acción endocrina), y estas comienzan al igual que otras hormonas polipeptídicas a iniciar sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos presentes en las células diana (Abbas y cols. 2000).

Ante cambios vasculares, las células endoteliales expresan moléculas de adhesión, por lo que los neutrófilos se les unen y emigran desde la sangre hacia el sitio de reacción, una vez unidos y activados por los mediadores locales o incluso por el patógeno en caso de infección, liberan agentes quimiotácticos que atraen a los macrófagos, los cuales incrementan la fagocitosis y la liberación de mediadores y citocinas, entre las que se encuentran el TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estas tres citocinas a nivel local promueven la coagulación (para limitar la extensión de la reacción al tejido próximo) e incrementan la permeabilidad vascular. El TNF- α y la IL-1 β inducen el aumento de la expresión de moléculas de adherencia sobre las células endoteliales, posteriormente los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos que reconocen estas moléculas, se adhieren y luego pasan a través de la pared vascular hacia los espacios tisulares; aunque éstos no son sus únicos efectos (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez 2007).

1.4.2. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Se hace referencia al TNF como TNF α para diferenciarlo del TNF- β o linfoxina, estrechamente relacionado, esta citocina fue identificada inicialmente como una sustancia que se encontraba en el suero de animales tratados con LSP bacteriano,

o endotoxina, y causaba necrosis tumoral *in vivo*. Su principal fuente celular son los fagocitos mononucleares activados, aunque también puede ser secretado por las

células T estimuladas por antígenos, células NK (*natural killer*) y mastocitos y es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a las bacterias gramnegativas y a otros microorganismos infecciosos y es responsable de muchas complicaciones sistémicas de las infecciones graves (Abbas y cols. 2000).

Existen dos receptores distintos para TNF, cuyos tamaños moleculares son de 55 kDa denominado receptor de TNF tipo 1 (TNF-R1 o receptor p55) y de 75 kDa denominado receptor de TNF tipo 2 (TNF-R2 o receptor p75) (Rainer S y Gerd H 2016).

Se le ha relacionado al TNF- α de manera crítica con la patogénesis de diversas enfermedades crónicas inflamatorias incluyendo la diabetes, esta citocina regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como la activación de los leucocitos, la liberación de diversas citocinas y quimiocinas, y la producción de especies reactivas de oxígeno a su vez parte de la estructura proteica de ambos receptores (TNF-R1 y TNF-R2) es compartida. Una vez iniciada la señalización celular mediada por TNF- α -TNFR1 (y sus proteínas accesorias), el complejo TRADD-RIP1- TRAF2 es liberado de TNF-R1, e inmediatamente después comienza la fosforilación de los inhibidores del factor nuclear κ B (NF- κ B) mediante diversas cinasas, evento que lleva a la liberación y translocación del factor de transcripción NF- κ B desde el citoplasma al núcleo; finalmente este factor de transcripción actúa en el núcleo celular, donde se une a secuencias específicas del ADN y expresa genes involucrados con la síntesis de proteínas relacionadas con la inmunidad, inflamación, autoinmunidad y maduración de la respuesta inmune innata y adaptativa. Aunque TNFR1 dispara la respuesta inmune inflamatoria mediada por TNF- α , se ha observado que TNFR2 está involucrado en la proliferación de las células del sistema inmunitario, citotoxicidad y activación de NF- κ B (Fragoso L y cols. 2013)

Está bien documentado que la inflamación es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la disfunción endotelial y el aumento de la expresión de esta citocina de manera local o en la circulación promueve la disfunción endotelial a través de inducción de ROS. La producción de ROS a través del TNF- α estimula la síntesis de diversas citocinas (incluyendo el mismo gen de TNF- α) a través del factor de transcripción NF- κ B (Zhang H y cols. 2009).

Cuando el estímulo para la producción de TNF es suficientemente intenso, se producen cantidades tan grandes de esta citocina que entra al torrente sanguíneo y actúa a distancia, como una hormona endócrina, las principales acciones sistémicas son las siguientes (Fig 2.) (Abbas y cols. 2000).

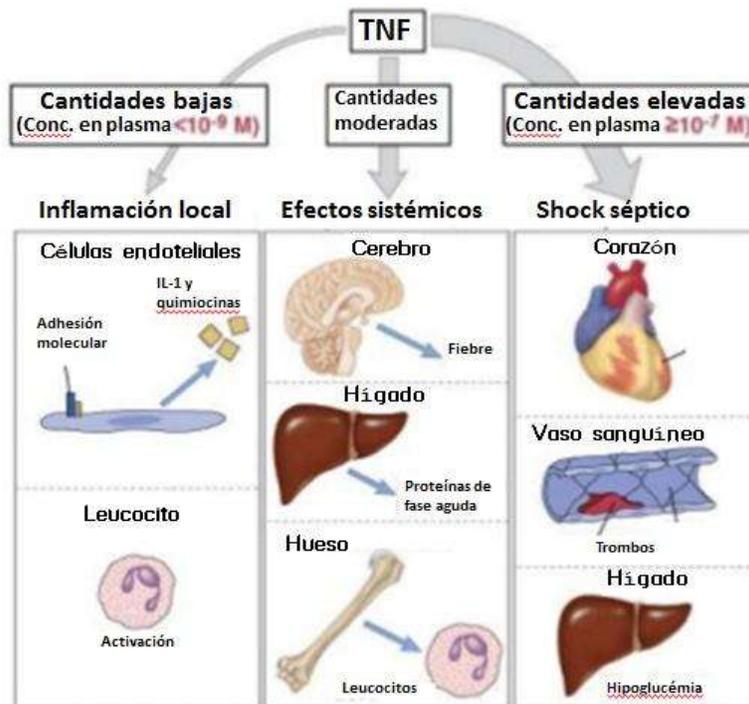


Figura 2.- Acciones biológicas del factor de necrosis tumoral α (Abbas y cols. 2000).

1.4.3. Interleucina 1 (IL-1 β)

La interleucina 1 es una molécula involucrada en múltiples reacciones como inflamación, defensa contra infecciones virales o bacterianas, desarrollo de fiebre y respuesta al estrés, existen dos formas de la IL-1, llamadas IL-1 α e IL-1 β , estas efectos biológicos muy similares compartiendo el mismo receptor (IL-1RI) sin embargo la IL-1 α se secreta en cantidades muy inferiores a diferencia de la IL-1 β la cual es la responsable de la mayoría de los efectos biológicos (Nakae S y cols. 2001).

Cuando se secreta en concentraciones bajas, la IL-1 actúa como mediador de la inflamación local. Actúa sobre células endoteliales aumentando la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión leucocitaria, como ligando para integrinas; Cuando se secreta en cantidades mayores, la IL-1 entra a la circulación

y ejerce efectos endócrinos. La IL-1 sistémica comparte con el TNF la capacidad de producir fiebre, inducir síntesis hepática de proteínas plasmáticas de fase aguda e iniciar con el deterioro metabólico (Abbas y cols 2000).

Las principales dianas celulares y sus efectos biológicos del IL-1 se presentan en la Fig. 3.

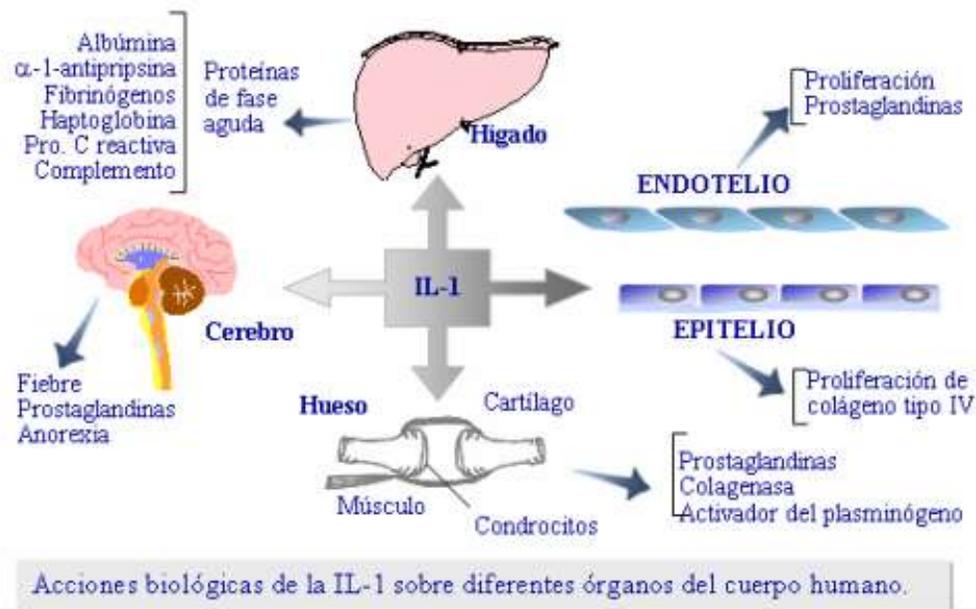


Figura 3.- Acciones biológicas de la Interleucina 1 β (Suárez A y cols. 2003).

1.4.4. Interleucina 6 (IL-6)

Es una citocina que actúa en la inmunidad innata y adaptativa. Es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos y otras células en respuesta a microorganismos y a otras citocinas, principalmente a la IL-1 y al TNF. También la sintetizan algunas células T activadas. La forma funcional de la IL-6 es un homodímero en el que cada subunidad forma un dominio globular de cuatro hélices α . El receptor de la IL-6 consta de una proteína de unión

a citocinas y una subunidad transductora de señales; Ambas pertenecen a la familia de receptores de citocinas tipo I. La subunidad transductora de señales tiene un tamaño de 130 kDa y se denomina gp130; activa una vía de señalización de JAK/STAT y también es el componente de señalización de otros receptores de citocinas, la IL-6 tiene varias acciones diferentes, en la inmunidad innata, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos contribuyendo así a los efectos sistémicos de la inflamación, la denominada respuesta de fase aguda. En la inmunidad adaptativa, la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han

diferenciado en células productoras de anticuerpos (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro 2001).

La IL-6 actúa así mismo como factor de crecimiento para células plasmáticas neoplásicas (mielomas), y muchas células de mieloma que crecen de forma autónoma secretan IL-6 como factor de crecimiento autocrino. Además la IL-6 induce el crecimiento de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, los cuales derivan de mielomas (Abbas y cols. 2000).

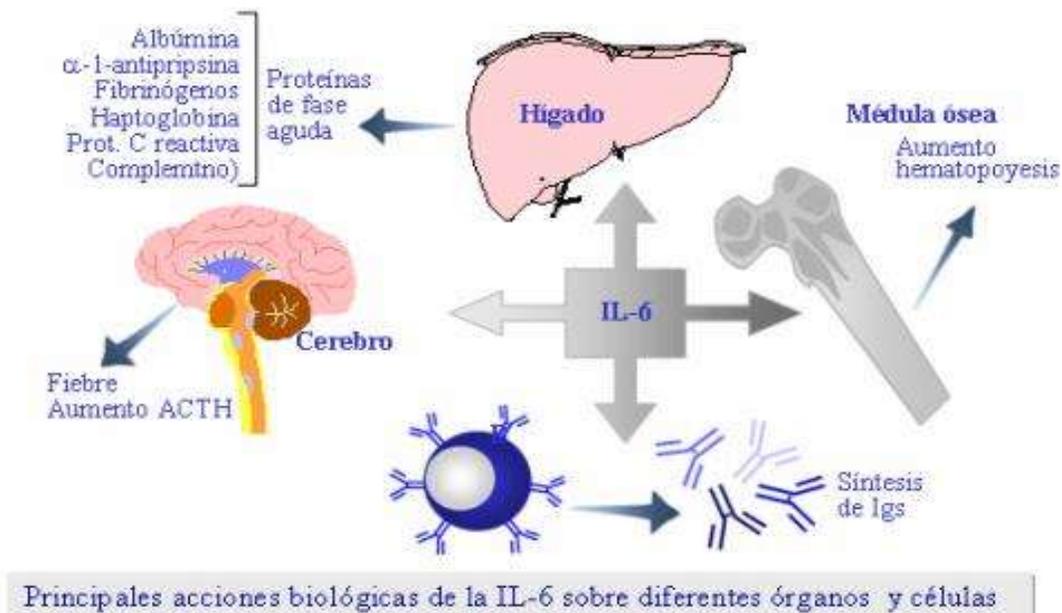


Figura 4.- Acciones biológicas de la Interleucina 6 (Suárez A y cols. 2003).

1.5. Citocinas proinflamatorias y su contribución a la resistencia a la insulina

La insulina es una hormona producida por las células β localizadas en el páncreas, y liberada hacia la circulación. Esta hormona juega un papel muy importante en el metabolismo de carbohidratos. Con la ayuda de la insulina las células de todo el cuerpo absorben la glucosa circulante para obtener energía (Meda Paolo, 2013).

La resistencia a la insulina es una condición en la cual el cuerpo produce insulina pero no la utiliza adecuadamente, cuando una persona tiene resistencia a la insulina, los niveles de glucosa se elevan debido a que la glucosa no entra a la célula para ser aprovechada como energía lo que conduce a prediabetes o a diabetes tipo 2 (NIH, 2014).

Se sabe que la resistencia a la insulina está directamente relacionada con la obesidad debido a una elevada exposición a nutrientes por parte de los tejidos, sin embargo investigaciones recientes indican que existen otros factores como la síntesis de moléculas de citocinas proinflamatorias (Muoio M y Newgard B 2008).

El TNF- α y la IL-1 β ejercen sus acciones más importantes en la inflamación se derivan de sus efectos sobre el endotelio, leucocitos y fibroblastos e incluyen la inducción de respuestas sistémicas de fase aguda. En el endotelio inducen un espectro de cambios, principalmente regulados al nivel de la transcripción de genes, sobre la síntesis de mediadores químicos, en los que destaca por su efecto en la resistencia a la insulina la IL-6 (Miranda-Garduño y Reza-Albarran, 2008).

Respecto a las citocinas, se ha señalado que tanto la IL-6 como el TNF- α interrumpen las cascadas de señalización requeridas para que se incorpore la glucosa a los tejidos y por lo tanto contribuyen a la resistencia a la insulina (Rosado-Pérez y cols. 2006).

El TNF- α disminuye la señalización intracelular del receptor de insulina en adipocitos, en células HepG2 (línea celular humana de carcinoma hepatocelular) y en células de músculo esquelético humano, a través de la inhibición de IRS-1 (substrato del receptor de insulina-1) haciendo a esta molécula un pobre sustrato para fosforilación de los residuos de tirosina mediada por el receptor de insulina, y por tanto disminuyendo la amplificación intracelular de la señal del receptor

insulínico, generando un estado de resistencia a la insulina, que trae consecuencias sobre el metabolismo celular (Ramírez A y Sánchez R, 2012).

1.6. Tratamiento farmacológico en la diabetes mellitus

El tratamiento farmacológico para tratar la diabetes mellitus incluye insulina y diversos agentes antidiabéticos como son los de la familia de las biguanidas, sulfoniureas, meglitinidas, tiazolidinedionas, inhibidores de la DPP-4 (Botargues M y cols. 2011), los fármacos orales son una alternativa más utilizada que la insulina ya que su administración es más fácil, menor costo y en general tiene una mayor aceptación (Balsells M y cols. 2015).

Al inicio del tratamiento los pacientes generalmente responden satisfactoriamente con los cambios en el estilo de vida y el inicio de la monoterapia con fármacos hipoglucemiantes orales (generalmente metformina) para controlar la glucosa en la sangre, la mayoría de ellos requieren dosis más altas y agentes adicionales en un esfuerzo por alcanzar los objetivos glucémicos, lo que ocasiona que finalmente muchos pacientes requerirán la adición de insulina a su régimen de tratamiento para mantener el control glucémico (Weiisman N y cols 2014). Sin embargo, existe inercia clínica para subir cada uno de estos escalones en el tratamiento de la enfermedad (sobre todo en la indicación de insulina, que genera resistencia entre pacientes y médicos de atención primaria) (Botargues M y cols. 2011).

Estos fármacos son muy efectivos, sin embargo, todos estos poseen efectos secundarios adversos principalmente trastornos gastrointestinales (Arredondo A e Icaza E, 2011).

Una efecto secundario adverso a un medicamento se puede definir como “cualquier respuesta a un fármaco que es nociva, no intencionada y que se produce a dosis habituales para la profilaxis, diagnóstico, o tratamiento” (Formulario Modelo de la OMS, 2004).

Existen un gran número de fármacos hipoglucemiantes, estos medicamentos son costosos y provocan efectos secundarios adversos. Productos naturales y algunos derivados de ellos han demostrado satisfactoriamente ser una fuente de productos bioactivos los cuales han sido usados en la medicina desde tiempos antiguos (Jadhav R y Puchchakayala G 2012).

En la tabla 2, se resumen los mecanismos de acción y los efectos adversos más relevantes de cada grupo de fármaco no insulínicos para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Tabla 2.- Fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes.

| Familia | Mecanismo de acción | Efectos adversos | Fármacos disponibles |
|---------------------------|--|--|-----------------------------|
| Biguanidas | Aumenta efecto de la insulina en los tejidos periféricos e inhibe la gluconeogénesis | Gastrointestinales | Metformina |
| Sulfoniureas | Estimulan la secreción de insulina en las células pancreáticas β | Hipoglucemias y aumento de peso | |
| Acarbosa | Inhibe la alfa-glucosidasa intestinal, lo que provoca un retardo en la absorción de carbohidratos. | Gastrointestinales | Acarbosa |
| Análogos del GLP-1 | Estimula la secreción de insulina cuando los nutrientes llegan al intestino. | Nauseas, vómitos y prurito en el sitio de la inyección | Exenatida, liraglutida. |
| Meglitinidas | Incrementan la secreción de insulina. | Hipoglucemias y aumento de peso | Repaglinida, Nateglinida |
| Tiazolidineidonas | Incrementan la sensibilidad a la insulina en los | Mayor incidencia de fracturas, aumento | Rosiglitazona, Pioglitazona |

| | tejidos periféricos. | de peso | |
|--------------------------------|--|--|-----------------------------|
| Inhibidores de la DPP-4 | Inhiben la dipeptidil peptidasa, enzima que desactiva péptidos intestinales, incluido el GLP-1, con lo cual aumenta su actividad, y por lo tanto la secreción de insulina. | Aumentan riesgo de infecciones respiratorias | Sitagliptina, Saxagliptina. |

Tomado de: (Botargues M y cols. 2011).

1.7. Tratamiento no farmacológico

Actualmente hay pruebas inequívocas de que la diabetes tipo 2 puede prevenirse o al menos demorarse mediante cambios en el estilo de vida como lo son medidas dietéticas y ejercicio, que generalmente dan como resultado la pérdida de peso y una mayor actividad física en aquellos individuos con alto riesgo de progresar a diabetes. La pérdida de peso y el control son los objetivos clave para las personas diabéticas. La pérdida de peso mejora la sensibilidad a la insulina y el control glucémico, los perfiles de lípidos, la presión arterial, la salud mental y la calidad de vida (Balaguer V y cols. 2012).

Un estudio realizado por Davies y colaboradores 2009 un equipo de salud el cual se encargó de darle atención integral a pacientes con diabetes tipo 2 mediante platicas las cuales iban orientadas a impactar en el cambio estilo de vida de los pacientes tales como promoción de la actividad física, correcta elección de alimentos y factores de riesgo cardiovasculares, se relacionó favorablemente a una mejoría en el nivel de la hemoglobina glucosilada, pérdida de peso, y disminución del hábito tabáquico (Davies MJ y cols. 2009).

Por otra parte Kattah y cols en 2007 también lograron una reducción en los niveles de hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos mediante un programa de atención integral multidisciplinaria a través de educación individualizada y sesiones

grupales. En este estudio participaron educadores en diabetes, enfermería, nutrición, endocrinología, podología, gimnasia terapéutica y psicología con el apoyo de otras especialidades médicas como cardiología, oftalmología y nefrología (Kattah W y cols. 2007).

Una de las recomendaciones que el Instituto Mexicano del Seguro Social da para el correcto tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención es el fomento de ejercicio físico para la pérdida de peso para un mejor control glucémico y así mejorar la resistencia a la insulina y prevenir riesgo cardiovascular (Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 en el primer nivel de Atención, 2014).

1.8. Plantas medicinales

Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica, así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda S y Koleff P 2005).

En México se cuenta con una vasta herencia prehispánica, mesoamericana, evidenciada por el abundante recurso de hierbas medicinales en el Códice de la Cruz-Badiano, que contiene 185 plantas con la descripción de sus características físicas, el modo de preparación como remedio y la manera de empleo en diversas situaciones patológicas (Figuroa HJL, 2009)

De manera resumida la Medicina tradicional o el uso de plantas medicinales tal y como hoy se practican en México, pasaron previamente por las siguientes etapas:

- La medicina prehistórica (±40,000 a.C. al 20,000 a.C.)
- Prehispánica (2000 a.C. al 1519 d.C.)
- Colonial (1519-1821)
- Independiente (1821-1910)

- Contemporánea (1910 Al presente)

Los cinco periodos pueden agruparse en dos grandes periodos: el prehistórico propiamente dicho (\mp 4000 a.C. al 2000 a.C.) y el Histórico (2000 a.C. al presente) (Rojas AM 2009).

A principios del siglo IX se han identificado un gran número de metabolitos secundarios biológicamente activos de origen vegetal los cuales se usan en la industria farmacéutica, de sabores, pesticidas, de alimentos entre otros (Douglas K, 1986).

A pesar de que en la actualidad existe un enorme progreso en el tratamiento de la diabetes usando hipoglucemiantes orales, la búsqueda de nuevos fármacos continua debido a que los fármacos existentes poseen ciertas limitaciones. Los fármacos derivados de plantas con actividad antidiabética ya son comercializados y se consideran como medicina moderna, muchos de los compuestos de las plantas han sido utilizados en el tratamiento de la diabetes (Arumugam G y cols. 2013).

En la actualidad el uso de plantas medicinales en la medicina tradicional se mantiene como la fuente más accesible para el tratamiento de diversas enfermedades en el sistema de atención primaria de salud en países de escasos recursos (Maroyi A. 2013).

La Organización Mundial de la Salud estima que más del 80% de las personas recurre a la medicina tradicional, mayormente a las plantas, para el tratamiento de ciertas enfermedades, y un 85% de la medicina tradicional implica el uso de extractos de plantas (Ghenó HJ 2010).

Desde hace algunos años, tanto los países desarrollados como aquellos del tercer mundo con escasos recursos económicos, han retomado y desarrollado el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos (García B y cols. 2002).

En México alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente el 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada 7 posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo solo en 5% de estas especies (Ocegueda SM y cols. 2005).

Existe un amplio cúmulo de especies vegetales, cuya acción terapéutica aún no se ha confirmado. Es por eso que la herbolaria mexicana representa un recurso viable para encontrar nuevos tratamientos contra las enfermedades degenerativas, como el cáncer, la artrosis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la diabetes (Figueroa H. 2009).

1.8.1. Compuestos activos de las plantas

Actualmente, se tiene el conocimiento de que muchos compuestos derivados de plantas, cuya actividad farmacológica es importante, se producen mediante vías metabólicas adicionales al metabolismo primario, conocido como metabolismo secundario (Esquivel-Gutiérrez y cols. 2012).

Estos metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales:

1. Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
2. Compuestos fenólicos. Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
3. Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
4. Alcaloides (Ávalos G y Pérez-Urria 2009).

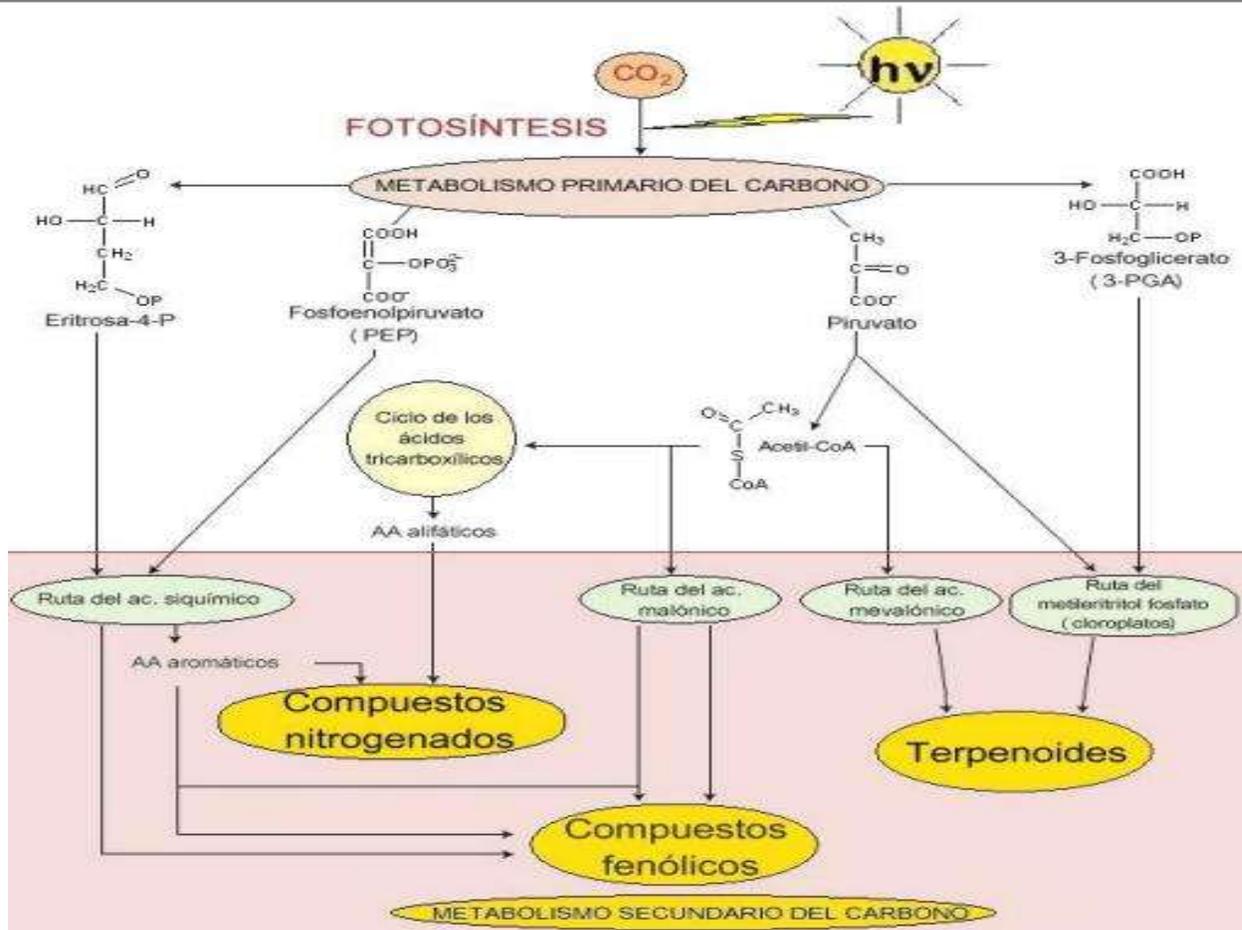


Figura 5.- Rutas de síntesis de metabolitos secundarios (Ávalos G y Pérez-Urria 2009).

1.8.2. Compuestos fenólicos y su biodisponibilidad

Uno de los grupos de metabolitos secundarios a los que se les atribuye beneficios a la salud contra diversas patologías son los polifenoles estos están involucrados generalmente en la defensa contra la luz ultravioleta, radiación o agresión contra algunos patógenos. Se han identificado más de 8,000 compuestos polifenólicos y en la última década, estos han adquirido mayor importancia debido a los beneficios que estos producen en el organismo ya que estos poseen actividad antioxidante (Bhooshan P e Ibrahim R 2009)

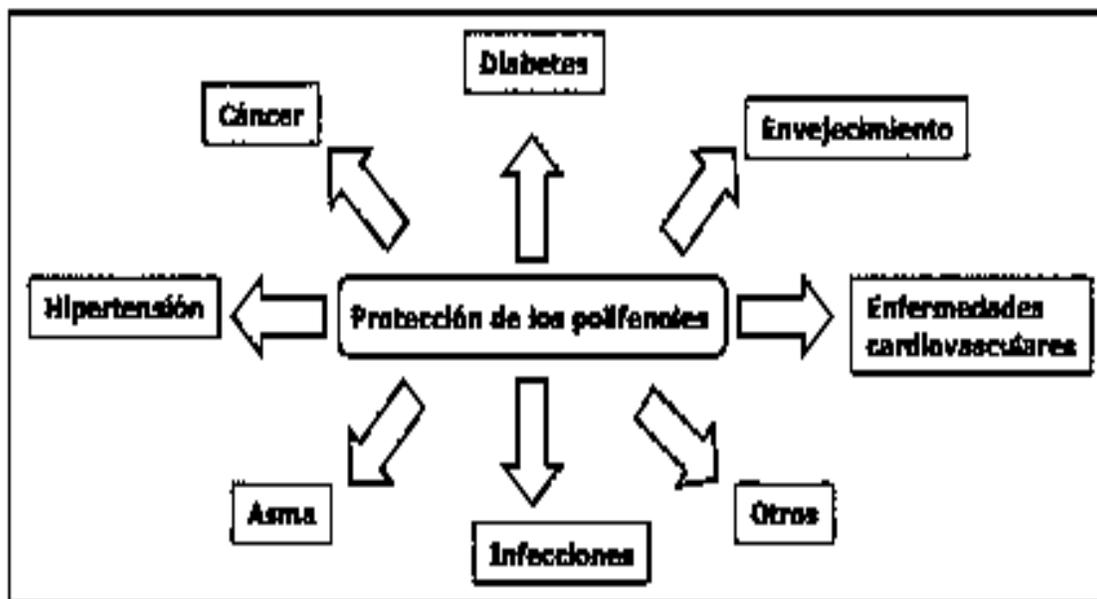


Figura 6.- Acciones biológicas de los polifenoles en el cuerpo humano (Bhooshan P e Ibrahim R 2009).

Las sustancias fenólicas o polifenoles constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de relativamente elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados. Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica. Los flavonoides, con estructura básica C6-C3-C6, incluyen a las antocianinas, los flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles.

Otro subgrupo importante es el de los fenil propanoides que incluye a los derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico). También tienen importancia los estilbenoides (resveratrol) y los derivados del benzoico (ácido gálico y elágico, etc.). Sólo de flavonoides se conocen más de 5.000 compuestos diferentes en la naturaleza. Estos efectos sólo tienen reflejo en la fisiología cuando forman parte de un hábito alimentario que hace que se ingieran estas sustancias durante un largo periodo de tiempo, cuando los síntomas de la enfermedad que ayudan a combatir, todavía no han aparecido, Esto se debe a que se trata de

moléculas con relativamente baja actividad biológica, sobre todo cuando los comparamos con fármacos (Tómas-Barberán 2003).

La biodisponibilidad, desde el punto de vista de la nutrición, se expresa frecuentemente como la proporción de la dosis ingerida que es excretada en orina comparada con la excretada en heces. Sin embargo, los compuestos liposolubles, no serán directamente excretados en orina sino que aparecerán como metabolitos hidrosolubles. Principalmente, en el caso de compuestos liposolubles, parte de estas sustancias pueden almacenarse en los tejidos adiposos, de forma que la ingesta menos la excreta no reflejará la historia real del destino biológico de estos metabolitos. Tanto el contenido plasmático como el urinario de un compuesto determinado se pueden utilizar para reflejar su absorción en el tracto gastrointestinal. Muchos compuestos son muy metabolizados, y su biodisponibilidad total se ve reflejada en la cantidad del compuesto de partida más la de todos sus metabolitos. Muchos compuestos pueden sufrir una gran modificación en el tracto gastrointestinal antes de la absorción inicial o tras la excreción biliar previa a la reabsorción, posterior metabolismo, posible degradación y para terminar con la excreción. Los flavonoides no son muy solubles ni en solventes orgánicos ni acuosos y se encuentran presentes generalmente en alimentos en combinaciones con azúcares en forma de glicósidos, que son más solubles que las correspondientes agliconas, y que pueden necesitar una hidrólisis enzimática de la porción glicídica mediante glicosidasas bacterianas o humanas antes de la absorción (Tómas-Barberán 2003).

Uno de los factores que influye en la biodisponibilidad es la estructura química del compuesto. En la mayoría de los alimentos los polifenoles se encuentran como polímeros con formas glicosiladas: la parte que contiene el azúcar es conocido como glicona, y la parte que no contiene el azúcar (el polifenol) es conocido como aglicona. Cuando los polifenoles contienen esta estructura deben ser hidrolizados por las enzimas intestinales o por la microflora del colon antes de ser absorbidos (Archivo M. y cols. 2010).

1.8.3. Plantas con actividad antioxidante

Los antioxidantes secundarios se pueden encontrar en diferentes partes de las plantas y entre estos se encuentran los carotenoides, vitaminas, fenoles y flavonoides. La categoría de los antioxidantes y sus funciones son las siguientes: Enzimas y cofactores; moléculas de unión a metales (Ferritina, transferina y albumina); vitaminas (A, C y E); pigmentos (carotenoides, polifenoles como los flavonoides, taninos, antocianinas y clorofilas) (Butnariu M. y Grozea I, 2012).

La vitamina C es considerada el antioxidante soluble en agua más importante en fluidos extracelulares, capaz de neutralizar a las especies reactivas de oxígeno en un medio acuoso antes de que la lipoperoxidación ocurra, a su vez se ha comprobado que la vitamina C es capaz de regenerar a la vitamina E (Percival M. 1996).

En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud ya que la capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos beneficiosos (Quiñones M. y cols. 2012).

Existe un gran número de investigaciones realizadas de diferentes plantas las cuales poseen capacidad antioxidante, como el caso de los frutos que producen las plantas del género *Rubus* estos poseen metabolitos con actividad antioxidante, aunado al alto contenido de antocianinas (Martínez-Cruz y cols. 2011).

En un estudio realizado en 2013 se midió la capacidad antioxidante de 6 diferentes plantas de las región huasteca usadas en la medicina tradicional, se encontró que las plantas seleccionadas efectivamente contienen compuestos antioxidantes, siendo esta una posible fuente de materia prima para el desarrollo de productos alimenticios y farmacéuticos (Reyes M. y cols. 2014).

1.8.4. Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante

Las plantas medicinales juegan un papel muy importante en el manejo de diversas patologías como la diabetes especialmente en países en vías de desarrollo en donde los recursos son escasos (Bnouham M y cols. 2006), debido a que el riesgo a desarrollar complicaciones de la diabetes se puede disminuir teniendo un adecuado control de la glucemia, componentes de nuestra dieta pueden ayudar a atenuar la glucemia postprandial en una persona con diabetes puede ser muy útil (Williams A.J. y cols. 2007).

Las plantas medicinales o sus extractos pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y la condición integral de pacientes con diabetes, no sólo por sus efectos hipoglucemiantes sino también al mejorar el perfil lipídico, el estado antioxidante y la función capilar (Yeh Y.G. y cols. 2003).

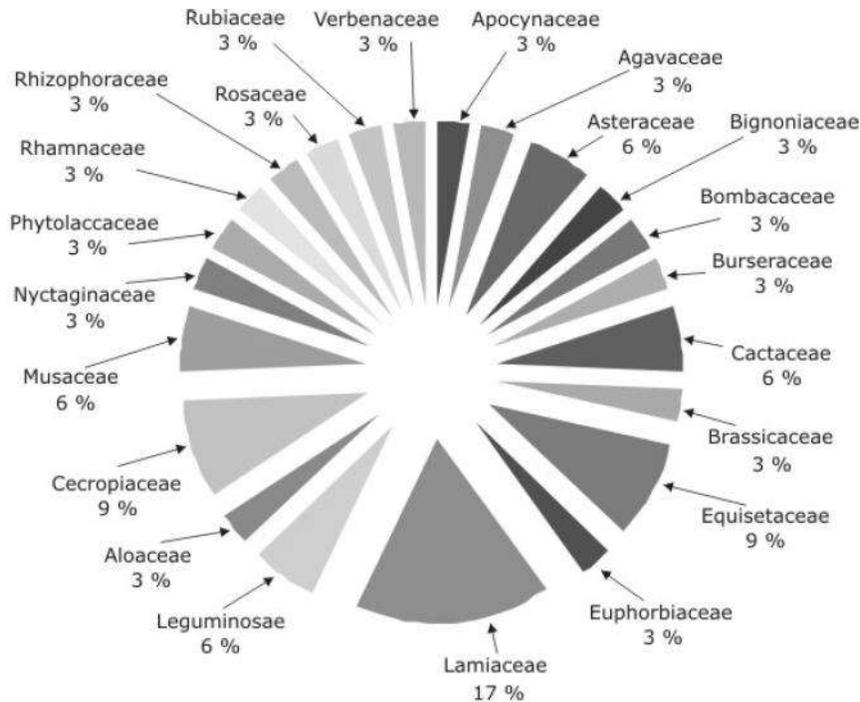
Estudios demuestran que las plantas poseen actividad antioxidante dentro del organismo tal es el caso de la investigación realizada por López V y colaboradores en el año 2007 en donde se analizaron 34 especies de plantas se encontró que la mayoría poseía actividad antioxidante incluso una de ellas (*Lythrum salicaria*) superando a la vitamina C (López V. y cols. 2007).

A su vez existen una enorme variedad de plantas que poseen efecto hipoglucemiante como la *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicifolia*, *Parmentiera*

edulis el cual se administró a ratones diabéticos y tuvo efecto similar a el fármaco tolbutamida (Pérez-Gutiérrez y cols. 1998).

Es importante mencionar que el fármaco más utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, la metformina es un derivado de un activo natural de la planta galega (*Galega officinalis*) la cual es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia de las herbáceas (Bailey C.J. y Day C, 2004).

En México se cuenta con una amplia variedad de plantas las cuales en la medicina tradicional se les atribuye tener efecto hipoglucemiante, en la gráfica 1 se clasifica la distribución de las plantas con efectos antidiabéticos por familia botánica y sus porcentajes de acuerdo con el número de especies empleadas en Oaxaca, México (Castro J.C. y cols. 2014).



Gráfica 1. Distribución de las plantas con efecto antidiabético por familia botánica y sus porcentajes de acuerdo al número de especies empleadas (Castro J.C. y cols. 2014).

Se ha demostrado que ciertas plantas como el compuesto activo epigallocatequina 3 galato proveniente un polifenol que se encuentra en el té verde ayudan a reducir la ingesta de alimentos, niveles plasmáticos de glucosa mediante la inhibición de la gluconeogénesis y el peso corporal (Fan C. y cols. 2007).

El uso de componentes bioactivos de ciertos alimentos han sido considerados como una herramienta para la prevención y el manejo de la diabetes y sus complicaciones (Bahadoran Z. y cols. 2013).

Concentraciones elevadas de glucosa aumentan la secreción de insulina y reduce la liberación de glucagón, lo cual inactiva a la enzima glucógeno fosforilasa (inhibiendo la glucogenólisis), y se activa la glucógeno sintasa (estimulando la síntesis de glucógeno), y aumentando las concentraciones de fructosa-1-6-

bifosfato. Estos eventos reducen la producción hepática de glucosa e incrementa el almacenamiento de glucosa en glucógeno (Villar-Palassi y Guinovart J. 1997).

Los principales objetivos enzimáticos para controlar la elevación de glucosa son la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa, ya que se ha demostrado que inhibiendo a esta enzima en modelos animales la glucosa circulante disminuye, algunas de las plantas que inhiben esta enzima son *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Casearia esculenta*, *Eugenia jambolana* entre otras. Otro mecanismo es a través de la activación de la AMPK protein cinasa lo cual inhibe la gluconeogénesis (Andrade-Cetto 2012).

A su vez un gran número de estudios reporta que los polifenoles poseen efectos antidiabéticos, estos metabolitos secundarios pueden alterar los niveles de glucosa sanguínea a través de diferentes mecanismos, incluyendo la inhibición de la glucosa en el intestino o en su absorción por los tejidos periféricos. Algunos polifenoles como las catequinas, epicatequinas, epigallocatequinas, isoflavonas proveniente de los frijoles de soya, ácido clorogénico y saponinas disminuyen S-Glut-1 mediador intestinal del transportador de glucosa (Bhooshan P y Ibrahim R. 2009).

Existen numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglucemiante. Algunas de ellas están siendo ampliamente estudiadas y aunque es necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos controlados, los resultados de los trabajos realizados en los últimos años son muy positivos, por la eficacia que se desprende de ellos y por la escasa toxicidad a dosis recomendadas, y por lo que podrían utilizarse durante largos periodos (López L.T. 2006).

Por la literatura se sabe que los polifenoles pueden actuar en diferentes partes del organismo mejorando el metabolismo de la glucosa, por ejemplo: a nivel intestinal se ha comprobado que ciertos polifenoles disminuyen absorción de la glucosa

mediante la inhibición de los transportadores GLUT2 y SGLT1, una vez evitando que se lleve a cabo una disminución en la absorción de la glucosa el páncreas se protege de la glucotoxicidad, a su vez se mejora la absorción de glucosa por parte de los tejidos periféricos. A nivel hepático los compuestos fenólicos son capaces de inhibir enzimas que participan en la gluconeogénesis por lo tanto disminuyen la liberación de glucosa hepática (Hanhineva K. y cols. 2010).

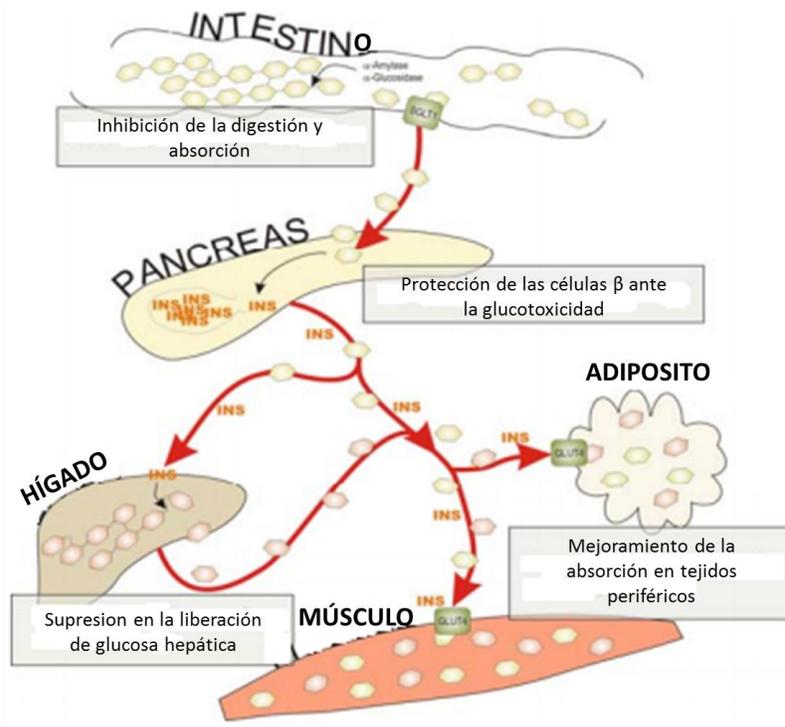


Figura 7. Principales sitios de acción de los polifenoles de la dieta sobre el metabolismo de los carbohidratos y de la homeostasis de la glucosa (Hanhineva K. y cols. 2010).

1.8.5. Plantas con actividad antiinflamatoria

La modulación de citocinas pro inflamatorias pueden ofrecer nuevos enfoques en el tratamiento de diversas patologías. Una estrategia en la modulación de la expresión de citocinas puede ser a través del uso de plantas medicinales, una clase de plantas medicinales conocidas como inmunomoduladoras, altera la actividad de la función inmune a través de la modulación de moléculas tales como las citocinas (Spelman K y cols. 2006).

Un inmunomodulador es definido como una sustancia biológica o sintética que puede estimular, suprimir o modular cualquiera de los componentes del sistema inmunitario incluyendo los sistemas innato y el adaptativo (Mukherjee y cols. 2014).

En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de plantas las cuales e ha demostrado que modulan la expresión de citocinas proinflamatorias.

Tabla 3.- Plantas con efecto modulador de citocinas proinflamatorias

| Citocina | Planta | Modelo | Efecto biológico |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------|
| TNF-α | <i>Acalypha wilkesiana</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Acanthopanax gracilistylus</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Acer nikoense</i> | <i>In vitro</i> , Murino | Disminuye |
| | <i>Allium sativum</i> | <i>In vitro</i> , Murino | Disminuye |
| | <i>Acalypha wilkesiana</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Aumenta |
| | <i>Acanthopanax gracilistylus</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Aumenta |
| IL-1β | <i>Ampelopsis brevipedunculata</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Coriolus versicolor</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Echinacea purpurea</i> | <i>In vitro</i> , Murino | Disminuye |
| | <i>Coriolus versicolor</i> | <i>In vitro</i> , Human | Aumenta |
| | <i>Harpagophytum procumbens</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |

| | | | |
|-------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------|
| | <i>Ludwigia octovalvis</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Echinacea purpurea</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Aumenta |
| | <i>Poria cocos</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Aumenta |
| | <i>Pinus maritima</i> | <i>In vitro</i> , Murino | Disminuye |
| | <i>Poria cocos</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| IL-6 | <i>Acalypha wilkesiana</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Acalypha wilkesiana</i> | <i>In vitro</i> , Human | Aumenta |
| | <i>Acanthopanax gracilistylus</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Allium sativum</i> | <i>In vitro</i> , Murino | Disminuye |
| | <i>Acanthopanax gracilistylus</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Aumenta |
| | <i>Aloe secundiflora</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Disminuye |
| | <i>Silybum marianum</i> | <i>In vitro</i> , Humano | Aumenta |

Tomado de: (Spelman K. y cols. 2006).

Existen dos tipos de inmunomoduladores basado en sus efectos: inmunosupresores e inmunoestimulantes. En la actualidad existen gran número de plantas medicinales que ayudan a disminuir el estrés oxidativo y por lo tanto mejoran la inmunidad (Das S. y cols. 2014).

Dentro de los mecanismos de acción asociados a la regulación del sistema inmune son modificaciones epigenéticas como metilación del ADN en secuencias reguladoras, supresión transcripcional de micro ARN lo cual influye en la expresión de algunos factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune (Cuevas A. y cols. 2013)

1.9. Capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

La capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) es un arbusto originario de México, perteneciente a la familia Asteraceae que puede medir hasta de 2 metros de altura,

con hojas alargadas y de color verde oscuro, con flores color amarillo de 1 cm de diámetro (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011).

En una investigación realizada por Cornejo y colaboradores donde estudiaron la composición, estructura y diversidad de la flora del cerro del Águila en Michoacán, encontrando que la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) forma parte del ecosistema de dicho lugar (Cornejo-Tenorio y cols. 2013).

Actualmente la capitaneja se utiliza en la medicina tradicional mexicana para tratar diferentes padecimientos entre los que se encuentra la diabetes.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los estudios previos realizados de la *Verbesina montanoifolia* y hasta donde se sabe, no existen estudios previos que reporten datos bromatológicos, de metabolitos secundarios, compuestos activos o de alguna actividad fisiológica reportada, sin embargo, en la medicina tradicional mexicana se recomienda para tratar diversos males como es la diabetes, en particular, en Morelia se vende para tratar la diabetes, la población la utiliza para éste fin.

II.- JUSTIFICACIÓN.

La diabetes es un problema de salud mundial y México ocupa actualmente el noveno lugar mundial en la prevalencia de diabetes. Esto es alarmante, y más aún cuando las proyecciones de los especialistas internacionales refieren que para el año 2025, el país ocupará el sexto o séptimo lugar, así mismo representa un problema grave para el sector salud debido a los altos costos para tratar esta enfermedad (Arredondo A. e Icaza E. 2011).

En México, el Instituto Mexicano para la Competitividad reportó que cada año, la diabetes absorbe 85 mil millones de pesos en costos sociales como tratamiento médico, ausentismo laboral y pérdidas de ingreso por mortalidad prematura (IMCO, 2016).

Aunado a esto se sabe que los medicamentos para tratar la diabetes tienen diversos efectos secundarios adversos que van desde problemas gastrointestinales hasta un aumento en las infecciones respiratorias y debido a esta razón en muchos de los casos existe poco apego al tratamiento (Botargues M y cols. 2011), de igual forma se requieren alternativas más económicas y menos agresivas para tratar este problema de salud es por eso que en los últimos años el uso de plantas medicinales ha adquirido mayor auge dentro del campo de la investigación para el tratamiento de diversas enfermedades entre ellas la diabetes, ya que son más económicas y poseen efectos secundarios adversos menos agresivos o en muchos casos no poseen ningún efecto secundario adverso (WHO, 2005).

Existen más de 1000 especies diferentes de plantas que se utilizan en todo el mundo para tratar la diabetes, ya que estas contienen diversos componentes activos como aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos polifenoles, antocianinas, alcaloides, flavonoides entre muchos otros los cuales poseen

propiedades hipoglucemiantes y ya ha sido demostrado su efecto en diversas investigaciones (Coman C y cols. 2012).

Existen plantas con actividad antioxidante e hipoglucemiante tal es el caso de la planta Picramila (*Picralima nitida*) y de la Nauclea (*Nauclea latifolia*) el extracto butanólico mostro tener un significativo descenso en las concentraciones de glucosa y de igual manera para el extracto etanólico de la planta Oxytenanthera (*Oxytenanthera abyssinica*) llegando a la conclusión de que pueden ser una alternativa viable para el tratamiento de la diabetes y diabetes gestacional (Yessoufou A y cols. 2013).

Por otra parte Di Lorenzo y colaboradores en el año 2013 realizaron una revisión sistemática en la cual encontraron 10 plantas con propiedades antiinflamatorias las cuales tenían diferentes mecanismos de acción entre los que destacaban la disminución de citocinas proinflamatorias (Di Lorenzo y cols. 2013).

Actualmente no existen reportes en los cuales se haya evaluado el efecto antioxidante e hipoglucemiante de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*), así como su efecto antiinflamatorio, por lo cual la presente investigación representa la primera investigación científica que genera un aporte al conocimiento así como una corroborar y enriquecer lo que menciona la medicina tradicional.

III.- HIPÓTESIS.

La administración oral de Capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) tiene un efecto hipoglucemiante y provoca un descenso en los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e IL-6).

IV.- OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la capacidad hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatoria de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) tras la administración oral de sus diferentes extractos en ratas hiperglucémicas

V.- OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Comprobar la actividad hipoglucemiante de extractos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).
2. Estandarizar la dosis óptima del extracto acuoso capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).
3. Cuantificar la actividad antioxidante de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).
4. Cuantificar la concentración de carbohidratos en la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).
5. Evaluar el efecto antiinflamatoria de la capitaneja de manera crónica (*Verbesina montanoifolia*).

VI.- MATERIALES

- ✓ Capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)
- ✓ Ratas macho Wistar 100-150 g
- ✓ Cánula intra-gástrica
- ✓ Reactivos de grado analítico
- ✓ Kits comerciales de ELISA para citocinas proinflamatorias

VII. MÉTODOS

7.1. Recolección e identificación de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

En la figura 8 se ubica el cerro del Águila, lugar donde se recolectó la planta para su posterior identificación en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde se llevó a cabo la correcta identificación, clasificación y número de folio (Anexo 2).

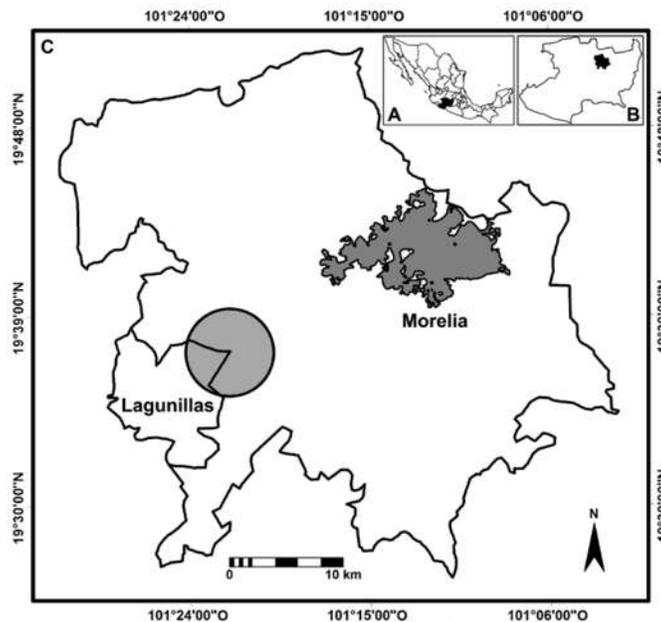


Figura 8.- Ubicación geográfica del cerro del Águila. A) Ubicación del estado de Michoacán en México, B) Localización de los municipios de Lagunillas y Morelia, donde se encuentra la zona de recolección del ejemplar C) Ubicación del cerro del Águila (Zacaría-Eslava y cols. 2011).

7.2. Obtención de diferentes extractos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

7.2.1. Obtención del extracto acuoso

Para la obtención del extracto acuoso de capitaneja se cortaron únicamente las hojas de la planta estas se trituraron en un mortero con agua destilada, posteriormente se filtró el homogeneizado y se centrifugó (3000 rpm, 15 min), para utilizar solamente el sobrenadante.

7.2.2. Obtención del extracto acetónico

Para la obtención del extracto acetónico o también llamado pigmentos acetónicos, las hojas de la planta de capitaneja se dejaron en un frasco previamente esterilizado en acetona pura durante 1 semana, esto con el fin de remover los compuestos poco hidroxilados como carotenoides y clorofila a y b, después se realizaron otros lavados con acetona con el fin de extraer los pigmentos acetónicos de la planta y posteriormente a través de destilación simple, removeremos el solvente, quedándonos únicamente con los pigmentos acetónicos (Delgado-Vargas y cols. 2000).

7.2.3. Obtención del extracto alcohólico

Una vez removidos los compuestos poco hidroxilados con ayuda de la acetona se procederá a la obtención del extracto alcohólico o también llamado pigmentos alcohólicos las hojas de la planta de capitaneja se dejaron en un frasco previamente esterilizado en alcohol etílico desnaturalizado al 70%, con el fin de obtener sustancias altamente hidroxiladas, esto durante 1 semana, posteriormente se realizaron otros lavados con alcohol con el fin de extraer los pigmentos de la planta posteriormente a través de destilación simple, removeremos el solvente,

quedándonos únicamente con los pigmentos alcohólicos (Delgado-Vargas y cols. 2000)

7.2.4. Obtención de la fracción sin pigmentos

Una vez que realizada la extracción de los pigmentos de la planta con acetona y alcohol, se procedió a realizar la obtención de la fracción sin pigmentos donde la planta se hidrató con agua destilada, se trituraron, y se filtraron el homogeneizado para posteriormente centrifugarlo a 2500 rpm durante 15 minutos obteniendo así la fracción sin pigmentos (Delgado-Vargas y cols. 2000).

7.3. Animales

Ratas macho Wistar de 100-150 g obtenidas del bioterio de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo los cuales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

El protocolo de investigación está aprobado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (CIC-2014, 2015 UMSNH otorgado a DC. Bertha Fenton N). Los procedimientos experimentales se realizarán 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 de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (publicación NIH N° 80-23, 1996). Se tomarán las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

7.4. Inducción a la hiperglucemia experimental

Para la inducción de la hiperglucemia experimental en las ratas se utilizó utilizando como inductor el fármaco aloxano (2, 4, 5, 6 - tetraoxypyrimidina; 2,4, 5, 6 -

pyrimidinetetrona), el cual se administró por vía intraperitoneal una vez que los animales cumplen un ayuno de 12 horas a una dosis de 200 mg/kg de peso del animal (Szkudelski T. 2001).

Se consideraron hiperglucémicos aquellos animales que sus niveles de glucosa sanguínea (evaluada con un glucómetro Accu-Chek) se encontraban por arriba de 180 mg/dL a las 24 h posteriores a la administración de aloxano.

El aloxano tiene una alta afinidad por la membrana celular de las células β pancreáticas que ocasiona alteraciones en su permeabilidad, lo cual puede explicar, en parte, la necrosis selectiva de las células β del islote pancreático.

Es importante resaltar que la glucosa protege a los islotes pancreáticos. Este modelo de hiperglucemia da como resultado niveles muy elevados de glucosa circulantes ya que destruye en su totalidad a las células β del páncreas (Ramos Rodríguez, 1994; Szkudeski, 2001).

7.5. Diseño experimental

7.5.1 Administración aguda

Para encontrar la dosis hipoglucemiante óptima de los diferentes extractos de la planta se realizaron dos diferentes pruebas: la primera prueba es la curva de glucosa en ayuno la cual usa en la clínica para el diagnóstico de la diabetes (Trujillo Arriaga H.M. 2007) y en la investigación de plantas con actividad hipoglucemiante usando animales de experimentación, dejándolos en ayuno de 12 horas únicamente con acceso a agua y se le administró utilizando una cánula de alimentación oral (Animal feeding needles 16X3” w/3, Candence Science Inc.) la dosis del extracto a evaluar para posterior mente realizar mediciones de glucosa obteniendo una gota de sangre de la cola de la rata a los 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos posterior a la administración del extracto de la planta, este

parámetro nos permite evaluar la gluconeogénesis hepática a partir del glucógeno o ciertos aminoácidos.

La segunda prueba es la prueba de tolerancia a la glucosa que al igual que en la curva de glucosa en ayuno se usa para el diagnóstico de la diabetes (Trujillo Arriaga H.M. 2007) y en la investigación donde de igual forma se dejan a las ratas se les deja en ayuno de 12 horas y se les da una carga de glucosa de 1.5 g de glucosa por kilogramo de peso y posteriormente se le da con una cánula intra gástrica el extracto a evaluar y se realizan mediciones de glucosa obteniendo una gota de sangre de la cola de la rata a los 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos posterior a la administración del extracto de la planta, y este parámetro ayuda a conocer la absorción y el metabolismo hepático de la glucosa, de los tejidos y producción de insulina (García-Verdi y cols. 2006).

Para la estandarización de la dosis hipoglucemiante óptima se formaron 7 grupos de 6 ratas cada uno,

- Grupo 1: Ratas hiperglucémicas con administración de insulina (6UI / kg).
- Grupo 2: Ratas hiperglucémicas con administración de solución salina.
- Grupo 3: Ratas sanas con administración de extracto de capitaneja.
- Grupo 4: Ratas hiperglucémicas con administración de extracto acuoso de capitaneja.
- Grupo 5: ratas hiperglucémicas con administración de extracto acetónico de capitaneja.
- Grupo 6: ratas hiperglucémicas con administración del extracto alcohólico de capitaneja
- Grupo 7: ratas hiperglucémicas con administración de la fracción sin pigmentos de la capitaneja

7.5.2 Administración crónica

Una vez encontrada la dosis hipoglucemiante óptima se realizó la administración crónica.

Se dividieron los animales en 4 grupos de 6 animales cada uno.

- Grupo I: Ratas sanas con administración de solución salina.
- Grupo II: Ratas hiperglucémicas con administración subcutánea diaria de insulina en una concentración de 6UI/Kg peso corporal.
- Grupo III: Ratas hiperglucémicas con administración de extracto de capitaneja (200 mg/Kg peso) con una administración única diaria oral por 60 días.
- Grupo IV: Ratas sanas con administración de extracto de capitaneja (200 mg/kg).

El peso corporal se medirá una vez a la semana hasta que se complete el periodo de 2 meses, así como los niveles sanguíneos de glucosa se medirán utilizando un Glucómetro cada semana durante el periodo experimental.

Se obtendrá el suero de los animales de experimentación y se guardarán a -70°C para los análisis posteriores, así como diferentes órganos para su posterior análisis histopatológico.

A momento de sacrificar a los animales estos se dejaron en ayuno de 12 horas para posterior mente administrarles una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 30-40 mg/kg de peso del animal (Forner y cols. 1990).

7.6. Estudios realizados a los extractos

7.6.1. Método de Brand Williams (1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH))

En este ensayo, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical. Se utilizara el compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) el cual es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que

absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. La reacción se realizó usando 3.9 ml de DPPH y 0.1 ml de las diferentes muestras problema con diferentes concentraciones (Brand-Williams y cols. 1995).

La absorbancia se leyó a 517nm a intervalos de tiempo diferentes hasta que la reacción alcanzó un equilibrio. El porcentaje de DPPH* remanente fue calculado con la siguiente formula:

$$\%DPPH_{rem} = 100X [DPPH]_{rem}/[DPPH]_{T=0}$$

A partir del gráfico de este porcentaje contra la concentración de la muestra se obtiene el EC50 definido como la cantidad de la muestra (g de muestra) necesarios para disminuir en un 50% la absorbancia. A valores más bajos de EC50 mayor la actividad antioxidante. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio a la concentración de EC50 (TEC50) se calcula gráficamente. Como el EC50 y el TEC50 afectan la capacidad anti radical se calcula la eficiencia anti radical (EA) que combina estos dos factores con la siguiente formula:

$$EA = 1/EC50 * TEC50$$

Este ensayo se realizó con diferentes extractos de la planta: Extracto acuoso, extracto acetónico y extracto alcohólico, estos se dejaron en la obscuridad a 30 min y se midió la absorbancia a 30 y 60 min. Para la obtención de los parámetros antes descritos

7.6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos de extractos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).

Se evaluó el contenido de Fenoles, polifenoles y flavonoides de extracto acuoso, extracto acetónico y extracto alcohólico de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).

Para la conocer el contenido total de flavonoides se utilizó el método de Dowd, se utilizó quercetina para la realización de la curva patrón para la cuantificación de flavonoides, y una determinación espectrofotométrica de 415 nm (Plazonić A y cols. 2009).

En cuanto a la cuantificación de fenoles y polifenoles se utilizó el método de Folin Cicalteu usando una curva patrón de ácido gálico y de fluoroglucinol respectivamente. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (EAG) g/100g de muestra seca y como equivalentes de fluoroglucinol g/100g.

En esta reacción los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo Folin Cicalteu (Tungstofosfato-molibdoosfato) formando sales de tungsteno y molidileno, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible a una determinación espectrofotométrica de 760 nm (Balinsky A y cols 2013).

7.6.3. Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)

El método Bradford se basa en utilizar un colorante hidrofóbico (comassie blue G-250) cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo que al entrar en contacto con la parte hidrofóbico del interior de una proteína se fija.

Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. La determinación del contenido proteico de una muestra requerirá la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con los que se construirá una curva de calibración empleando una proteína patrón utilizando albumina sérica bovina (Bradford M 1976).

Se utilizó albúmina de suero bovino para la realización de una curva patrón, en donde los valores los valores de las muestras problema se interpolaron con los valores de la curva y se obtuvo la concentración de proteínas del extracto.

7.6.4. Cuantificación de carbohidratos por el método de Benedict

Es una técnica rápida y sencilla para determinar la presencia de azúcares reductores (Cualquier azúcar que forme un aldehído en presencia de una solución alcalina es un azúcar reductor. Los tipos de azúcares reductores son glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa) en el cual se usa el reactivo de Benedict, el cual contiene ión cúprico formando un complejo con citrato en solución alcalina caliente. La glucosa y otras sustancias reductoras reducen el sulfato cúprico, de color azul a sulfato cuproso formando hidróxido cuproso amarillo o de óxido cuproso rojo que es insoluble.

Se utilizó glucosa para realizar una curva patrón, posteriormente se leyeron las absorbancias de las muestras y los valores obtenidos se interpolaron en la curva para así obtener la concentración de carbohidratos reductores.

7.6.5. Cuantificación de carbohidratos por el método de Dubois (Fenol-sulfúrico)

Este método propuesto por Dubois y colaboradores en 1956 se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como hetero-átomo. La condensación más común es con fenol. Este método es fácil, eficaz y rápido. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón, en donde los valores de las muestras se interpolaron en la curva para así obtener la concentración de carbohidratos reductores.

7.6.6. Cuantificación de carbohidratos por el método Método de Fehling.

Este ensayo identifica la presencia de azúcares reductores (aldosas: glucosa, ribosa, eritrosa, etc.), con la ayuda del reactivo de Fehling, se trata de una reacción redox en la que el grupo aldehído (reductor) de los azúcares es oxidado a grupo ácido por el Cu^{2+} que se reduce a Cu^{+} . Tanto los monosacáridos como los disacáridos reductores reaccionan con el Cu^{2+} dando un precipitado rojo de óxido cuproso. La reacción tiene lugar en medio básico por lo que es necesario introducir en la reacción tartrato sódico-potásico para evitar la precipitación del hidróxido cúprico.

Se realiza una curva patrón, en donde los valores de las muestras se interpolan en la curva para así obtener la concentración de carbohidratos reductores.

7.7. Medición de enzimas antioxidantes

7.7.1. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

Para la determinación cuantitativa *in vivo* de Superoxido Dismutasa se utilizaron estuches comerciales RANDOX en donde se siguieron las instrucciones del proveedor. El principio del ensayo consta en que la función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido (O_2^{\bullet}), producido durante un proceso oxidativo enérgico, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Este método emplea Xantina y Xantin oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción. Una unidad de SOD es la que causa un 50% de inhibición del valor de reducción de INT bajo las condiciones del análisis.

Los resultados se expresaron en Unidades de SOD / mg de Hb.

7.7.2. Determinación de la actividad de la catalasa

Se midió la cantidad de la enzima catalasa en páncreas, hígado y riñón.

El ensayo se realiza añadiendo buffer de fosfatos (50mM, pH 7.0) en una cubeta de cuarzo, se le agrega 100 μ L del tejido previamente homogeneizado con el mismo buffer y posteriormente se añade H₂O₂ 30mM disuelto en buffer de fosfatos, se mide en los tiempos 0 al 30 segundos con intervalos de 5 segundos a 240 nm.

Este ensayo se basa en que la catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en dos pasos: en un primer momento se forma un intermediario entre la enzima y el H₂O₂, luego la actividad peroxidativa de la enzima, cataliza la reacción del intermediario con un donador de hidrógenos como el metanol (Torres M y cols 2004).

La actividad de la catalasa se expresa en Unidades de catalasa / mg de proteína, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad catalasa} = (\text{Longitud de onda de la muestra/min}) (\text{Vol. Total}) (\text{Factor de dilución } 10) / (\text{Vol. Muestra}) (\text{min}) (0.0436) = 0.00218$$

Los resultados se expresaron en Unidades de catalasa / mg de proteína

7.7.3. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa

Para la determinación cuantitativa *in vivo* de superóxido dismutasa se utilizaron estuches comerciales RANDOX, en este método la Glutatión Peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del Glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El Glutatión oxidado (GSSG) en presencia de Glutatión Reductasa (GR) Y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm. Los resultados se expresaron como unidades de glutatión peroxidasa/ L de hemoglobina

7.7.4 Determinación de la actividad de la glutatión reductasa

Para la determinación cuantitativa *in vivo* de superóxido dismutasa se utilizaron estuches comerciales RANDOX en donde se siguieron las instrucciones del proveedor. El principio de este ensayo consta en que la enzima glutatión reductasa cataliza la reducción de glutatión (GSSG) en presencia de NADPH, el cual se oxida a NADP+. La disminución en la absorbancia se mide a 340 nm.

Los resultados se expresaron como Unidades de GR / L de Hemoglobina

7.8. Cuantificación del grado de lipoperoxidación

La determinación del malondialdehído (MDA) se realizó siguiendo el método de Ohkawa y colaboradores en 1979, el cual se basa en la reacción del tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto este del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Esta técnica se fundamenta en un procedimiento que comprende una etapa de precipitación proteica, durante la cual se incorpora el ácido tiobarbitúrico que produce una reacción directa con la fracción de malondialdehído presente en el suero. Esta fracción fue separada del mismo agregando butanol. El producto de MDA (TBARS) se determinó por colorimetría en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

Los resultados se expresaron como TBARS (mmol / g de tejido).

7.9. Medición del estado antioxidantes total (TAS)

Para la determinación cuantitativa del estado antioxidante total se utilizaron estuches comerciales de la marca RANDOX donde se siguieron las instrucciones del proveedor. En este método se utiliza el reactivo ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato]) se incubaba con peroxidasa (metamioglobina) y H₂O₂ para generar el radical catión ABTS•+. Este radical presenta una coloración verdeazulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de

antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo esta supresión, proporcional a la concentración de antioxidantes presentes en la muestra.

Los resultados obtenidos se expresaron como mmol / L

7.10. Cuantificación de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6)

Durante la administración crónica se sacrificaron ratas a la primera, segunda, cuarta, sexta y octava semana y se extrajo sangre por medio de punción cardiaca. La sangre se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se separaron los sueros a -70 grados centígrados. Posterior se evaluó la concentración de citocinas la cual se realizó a través del método de ELISA tipo sándwich con estuches comerciales Prepro Tech, siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar.
- Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (suero), de tal forma que si está presente el agente de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítotope diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

7.11. Análisis estadístico

Los resultados de los datos se expresaran en promedios con desviación estándar por medio de estadística descriptiva donde se utilizaron medidas de tendencia central como media y desviación estándar.

Se realizó un análisis de distribución de datos y posteriormente un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey, así como área bajo la curva.

Se consideró significativo la $P < 0.05$, para el cual se empleó el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0.

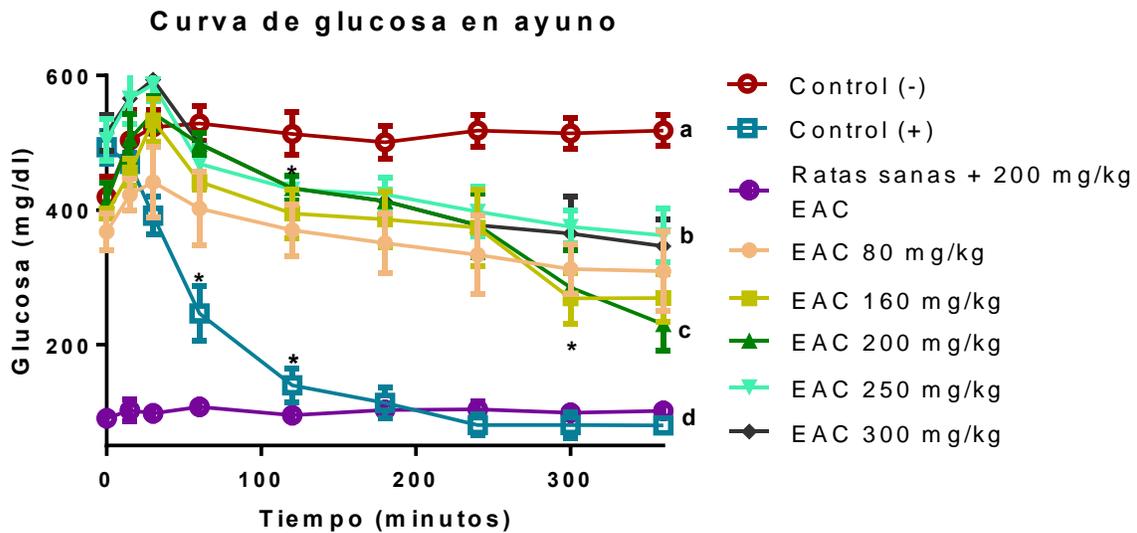
VIII. RESULTADOS

8.1. Estandarización de la dosis hipoglucemiante óptima

Para encontrar la dosis hipoglucemiante óptima se realizó en primera instancia una curva de glucosa en ayuno y se probaron diferentes dosis para encontrar cual tenía la mejor actividad hipoglucemiante.

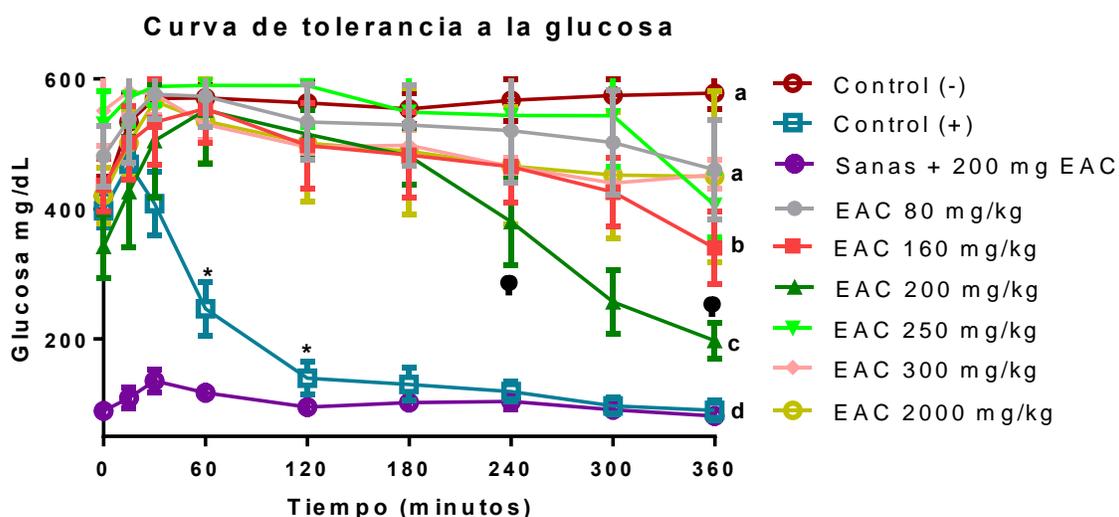
8.1.1. Extracto acuoso de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

A continuación en la Grafica 2 se muestran los resultados obtenidos de una curva de glucosa en ayuno utilizando diferentes dosis de extracto acuoso de capitaneja, en donde podemos observar al grupo control (+) que comienzan a descender los niveles de glucosa circulante en los primeros minutos y logra niveles normales de glucosa antes del minuto 200. Se puede apreciar al grupo control (-) al cual se le administró solución salina y se observa como los niveles de glucosa se mantienen elevados durante todo el experimento. Posteriormente se aprecia que la dosis hipoglucemiante más efectiva fue la de 200 mg/kg la cual tuvo diferencia significativa en comparación con la mayoría de las dosis probadas.



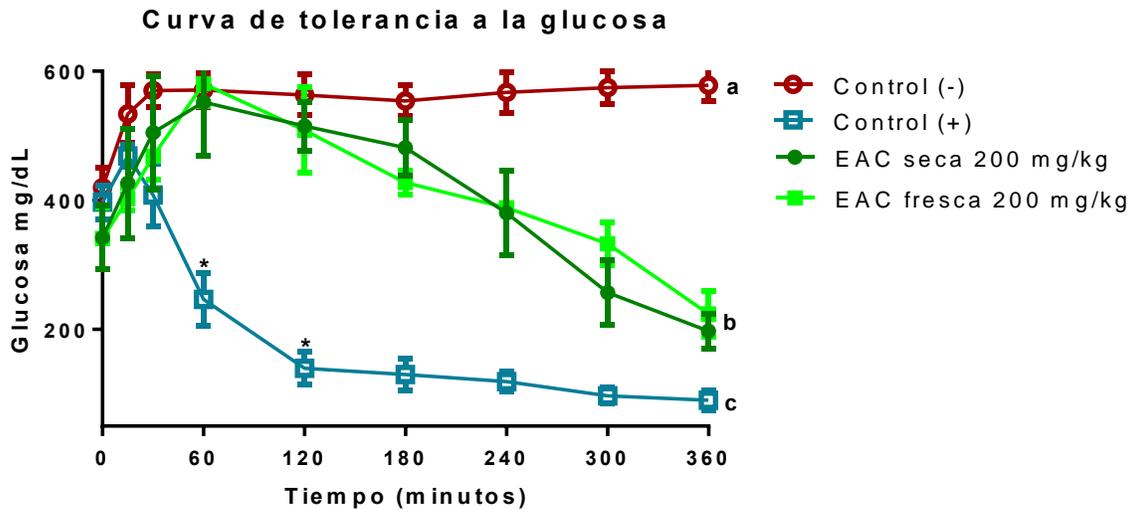
Gráfica 2. Curva de glucosa en ayuno con diferentes dosis de extracto acuoso de capitaneja (ECC) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo de las diferentes dosis de extracto crudo de capitaneja (80, 160, 200, 250, 300 mg/kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b, c y d) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-) = 100%, Control (+) = 31.35%, EAC 80 mg/kg= 69.58%, EAC 160 mg/kg = 73.24%, EAC 200 mg/kg= 77.37%, EAC 250 mg/kg = 84.0052%, EAC 300 mg/kg = 83.36%, ratas sanas + 200 mg/kg EAC= 19.69%.

En la gráfica 3 se pueden apreciar las diferentes dosis probadas del extracto acuoso de capitaneja que utilizamos para encontrar la dosis hipoglucemiante óptima, en donde se observar de nueva cuenta que la dosis más efectiva fue la de 200 mg/kg de peso corporal, esta dosis fue diferente significativamente que todas las demás dosis probadas.



Gráfica 3. Curva de tolerancia a la glucosa con diferentes dosis de extracto acuoso de capitaneja (EAC) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo de las diferentes dosis de extracto acuoso de capitaneja (80, 160, 200, 250, 300 y 2000 mg/kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (* y φ) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b, c y d) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 30.67%, EAC 80 mg/kg= 93.50%, EAC 160 mg/kg= 84.04%, EAC 200 mg/kg = 73.62%, EAC 250 mg/kg = 97.81%, EAC 300 mg/kg = 87.47%, EAC 2000 mg/kg = 86.63% y ratas sanas + EAC= 18.03%.

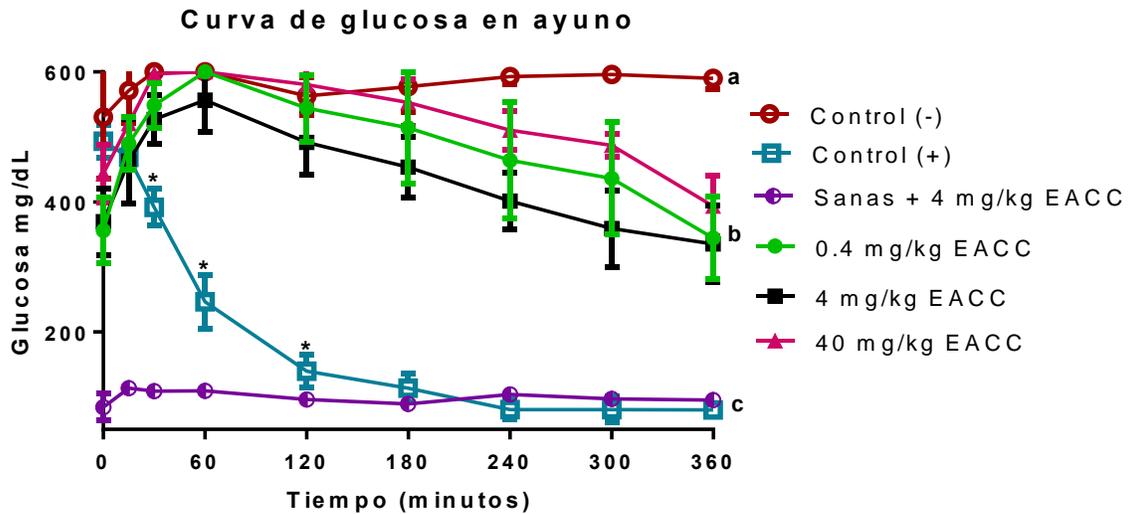
Una vez que se corroboró el efecto hipoglucemiante de la capitaneja se procedió a comparar el efecto de la planta comprada en el mercado con la planta recolectada en el cerro del águila lo cual se muestra a continuación (Gráfica 4) ambas se utilizó la mejor dosis que previamente había sido determinada (200 mg/kg) y no se observó ninguna diferencia significativa entre ambos grupos.



Gráfica 4. Curva de tolerancia a la glucosa comparando el efecto del extracto acuoso de capitaneja (EAC) fresco y seco en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, el EAC seca y el EAC fresca ambos grupos con la misma dosis (200 mg/kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Nos muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 30.67%, EAC Seca 200 mg/kg = 73.62%, EAC fresca 200 mg/kg = 74.75%.

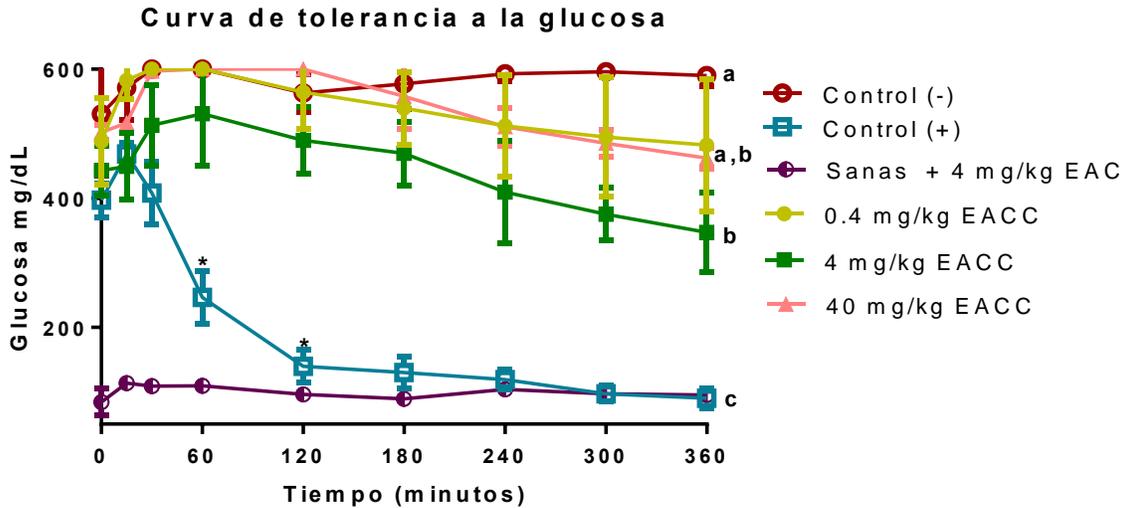
8.1.2. Extracto acetónico de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

En la gráfica 5 se muestran los resultados de la curva de glucosa en ayuno utilizando el extracto acetónico de la capitaneja, los cuales se utilizaron a diferentes dosis con el fin de encontrar la dosis hipoglucemiante óptima, a pesar de que no se logró un descenso muy notorio se observa que las tres diferentes dosis probadas fueron diferentes significativamente al grupo control (-) con un valor de $P < 0.05$ cuando se les comparó con el grupo control (-).



Gráfica 5. Curva de glucosa en ayuno de diferentes dosis de extracto acetónico de capitaneja (EACC) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes dosis de EAC probadas (0.4, 4 y 40 mg/ kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 27.48%, 0.4 mg/kg de EACC = 84.17%, 4mg/kg de EACC= 75.53%, 40 mg/kg de EACC= 90.83% y ratas sanas + 4mg/kg de EACC = 16.96%.

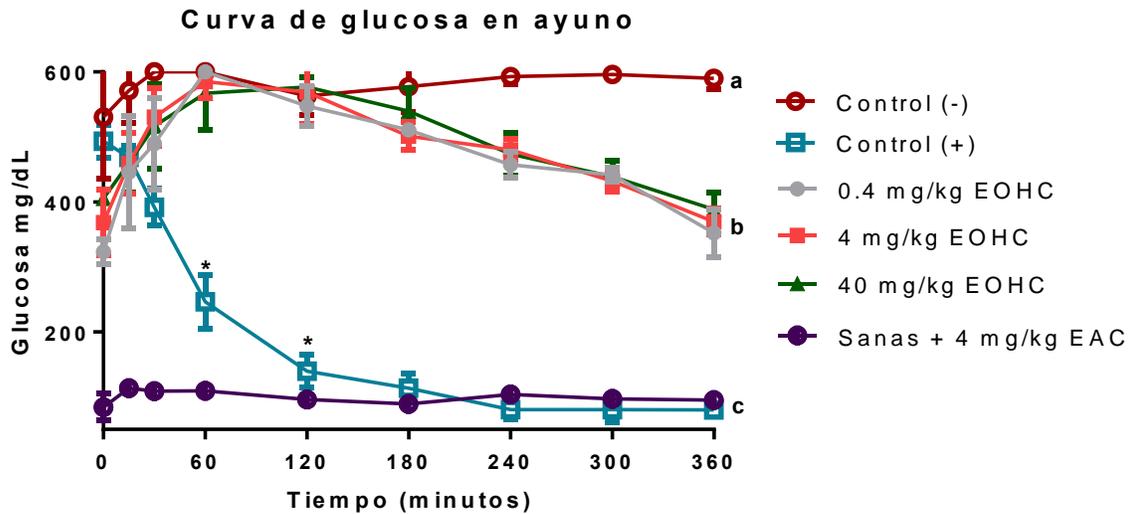
En la gráfica 6 se tienen los resultados obtenidos de la curva de tolerancia a la glucosa probando tres diferentes dosis de pigmentos acetónicos en la que se observa que únicamente la dosis de 4 mg/ kg tuvo diferencia significativa cuando esta se comparó con el grupo control (-), ya que tanto la dosis de 0.4 mg/kg y la dosis de 40 mg/kg no hubo diferencia significativa con el grupo control (-).



Gráfica 6. Curva de tolerancia a la glucosa de diferentes dosis de extracto acetónico de capitaneja (EACC) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes dosis de EAC probadas (0.4, 4 y 40 mg/ kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 29.50%, 0.4 mg/kg de EACC= 92.16%, 4mg/kg de EACC = 76.24%, 40mg/kg de EACC = 92.64%, ratas sanas + 4 mg/kg de EACC = 16.96%.

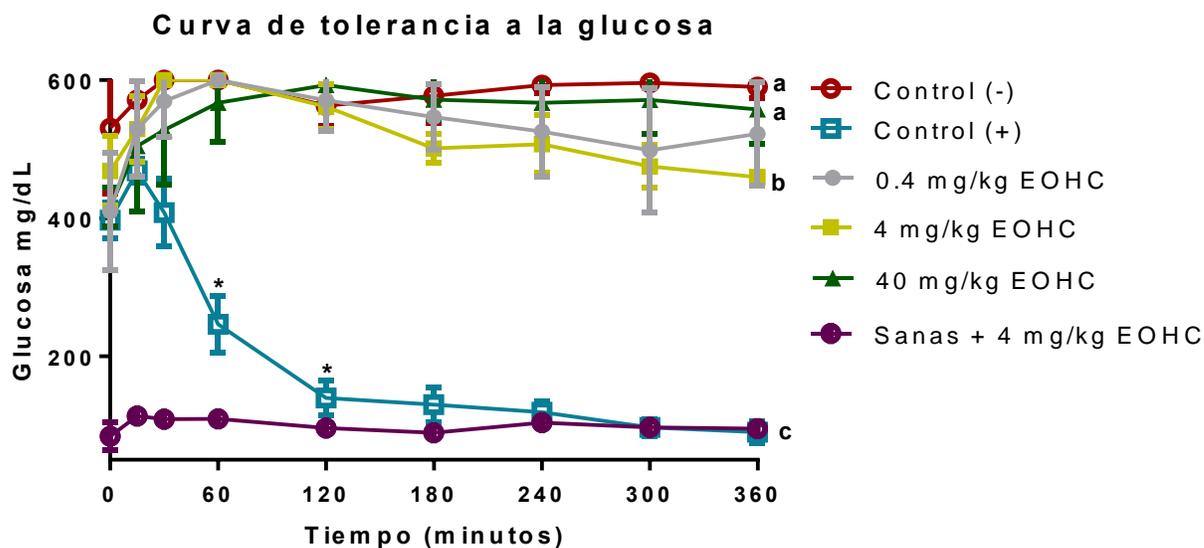
8.1.3. Extracto alcohólico de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

En la gráfica 7 observamos los resultados obtenidos de la curva de glucosa en ayuno utilizando tres diferentes dosis del extracto alcohólico de la capitaneja, donde se observa que no hubo diferencia significativa entre las tres dosis probadas, a su vez estas fueron diferentes significativamente cuando se les comparó con el grupo control (-) al cual se le administró únicamente solución salina.



Gráfica 7. Curva de glucosa en ayuno de diferentes dosis de extracto alcohólico de capitaneja (EOHC) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes dosis de EOHC probadas (0.4, 4 y 40 mg/ kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 27.48%, 0.4 mg mg/kg de EOHC = 83.18%, 4mg/kg de EOHC = 84.53%, 40mg/kg de EOHC = 85.72% y ratas sanas + 4 mg/kg de EOHC = 16.94%.

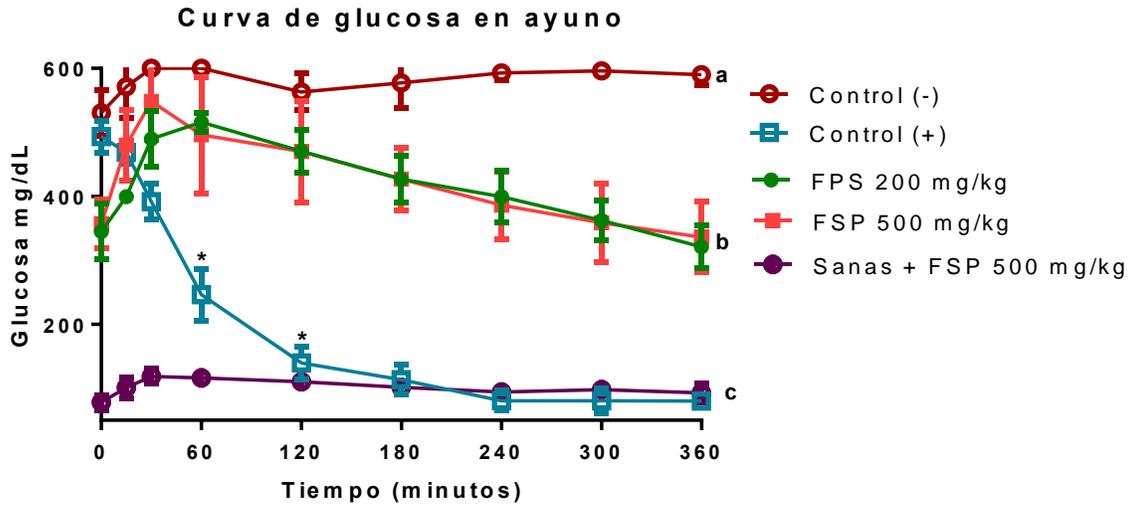
A continuación (gráfica 8) se muestran los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa utilizando tres diferentes dosis del extracto alcohólico de la capitaneja en donde se observa que solo la dosis de 4 mg/kg fue diferente significativamente al grupo control (-) ya que las dosis de 40 y 0.4 mg/kg fueron iguales significativamente al grupo control (-).



Gráfica 8. Curva de tolerancia a la glucosa de diferentes dosis de extracto alcohólico de capitaneja (EOHC) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes dosis de EOHC probadas (0.4, 4 y 40 mg/ kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 29.50%, 0.4 mg/kg de EOHC = 92.60%, 4 mg/kg de EOHC = 89.51%, 40 mg/kg de EOHC = 96.41% y ratas sanas + 4 mg/kg de EOHC = 16.96%.

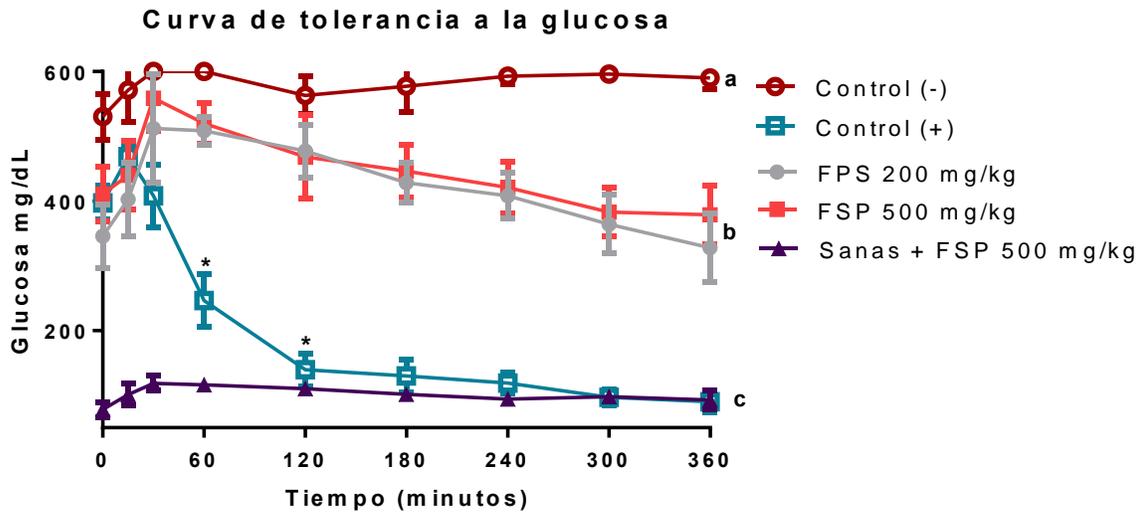
8.1.4. Fracción sin pigmentos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)

En la gráfica 9 se presentan los resultados obtenidos de la curva de glucosa en ayuno probando diferentes dosis de la fracción sin pigmentos donde se aprecia que entre las dos diferentes dosis no hubo diferencia significativa, ambas se comportaron de manera muy parecida, pero cuando estas se compararon con el grupo control (-) tuvieron diferencia significativa.



Gráfica 9. Curva de glucosa en ayuno de diferentes dosis de la fracción sin pigmentos (FSP) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes dosis de la FSP probadas (200 y 500 mg/ kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 27.48%, 200 mg/kg de FSP = 72.19%, 500 mg/kg de FSP = 72.74% y ratas sanas + 200 mg/kg de FSP = 17.57%.

En la gráfica 10 se observan los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa usando diferentes dosis de la fracción sin pigmentos, aunque ambas dosis no lograron un efecto hipoglucemiante en los animales muy marcado ambas fueron diferentes significativamente al grupo control (-) a cual solo se le administro solución salina



Gráfica 10. Curva de tolerancia a la glucosa de diferentes dosis de la fracción sin pigmentos (FSP) en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes dosis de la FSP probadas (200 y 500 mg/ kg), grupo control (+) Insulina (6UI / kg) y grupo control (-) Solución salina. (*) Muestra la diferencia entre un tiempo y otro, (a, b y c) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. Un área bajo la curva: Control (-)= 100%, Control (+)= 29.98%, 200 mg/kg de FSP = 72.95%, 500 mg/kg de FSP = 76.04% y ratas sanas + 500 mg/kg de FSP = 17.57%.

A manera de resumen de todas los diferentes extractos probados en la tabla 4 se muestran los porcentajes de efectividad hipoglucemiante, tanto en las curvas de glucosa en ayuno como en las curvas de tolerancia a la glucosa en donde se aprecia que el extracto acuoso de capitaneja fue el que obtuvo un mayor porcentaje de efectividad con un 44.4% en la curva de glucosa en ayuno y de un 42.39% en la curva de tolerancia a la glucosa

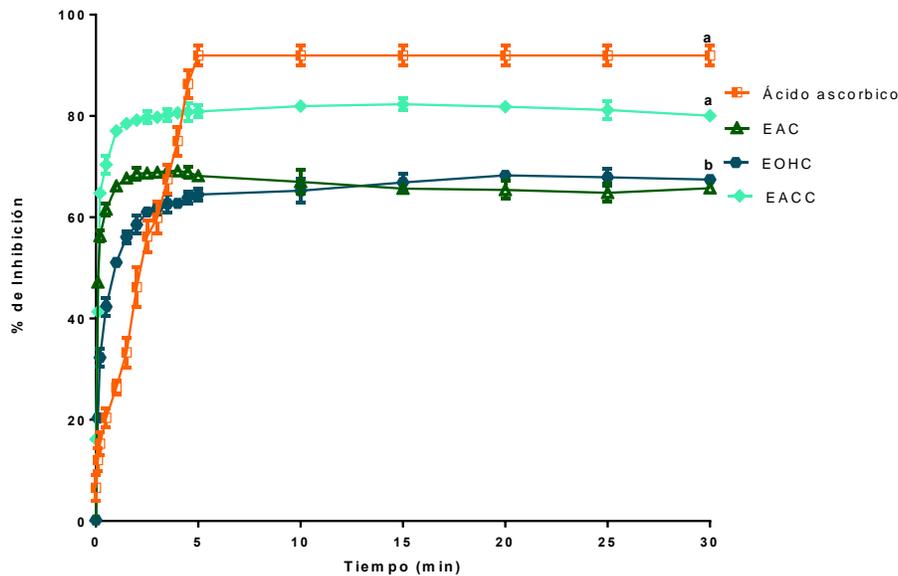
Tabla 4.- Tabla de efectividad hipoglucemiante de diferentes extractos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).

| Tipo de extracto | Dosis | Curva de glucosa en ayuno | Curva de Tolerancia a la glucosa |
|------------------------|-----------------|---------------------------|----------------------------------|
| Extracto acuoso | 200 mg/kg | 44.4% | 42.39% |
| Extracto acetónico | 4 mg/kg | 9.2% | 21.4% |
| Extracto alcohólico | 40 mg/kg | 4.1% | Nula |
| Fracción sin pigmentos | 200 y 500 mg/kg | 5.8% | 8.0% |
| Insulina | 6 UI/kg | 83.7% | 77.3% |

8.2. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).

8.2.1. Método de Brand Williams (1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH))

La gráfica 11 se aprecia una cinética antioxidante usando como control el ácido ascórbico y los diferentes extractos: extracto acuoso, alcohólico y acetónico, se observa como el ácido ascórbico logra un porcentaje de inhibición de casi el 100% a los 5 minutos, sin embargo los 3 extractos de capitaneja logran reaccionar con el DPPH de una manera más rápida que el ácido ascórbico y logran estabilizarse antes de los 5 minutos.



Gráfica 11.- Cinética antioxidante del ácido ascórbico, extracto acuoso de capitaneja, y los extractos alcohólico y acetónico de capitaneja (*Verbessina montanoifolia*). (a, b, c y d) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$. EAC= Extracto acuoso de capitaneja, EOHC= Extracto alcohólico de capitaneja, EACC= Extracto acetónico de capitaneja.

Una vez que se realizó la cinética antioxidante se midieron diferentes parámetros como el EC50 (Concentración necesaria para disminuir el DPPH AL 50%) donde este valor es menor en los 3 diferentes extractos comparándolo con el ácido ascórbico. Otro de los parámetros que se obtuvieron fue el TEC 50 (Tiempo para reducir el DPPH a la mitad) donde el valor fue menor en los tres extractos comparándolo con el ácido ascórbico. Por último la eficiencia anti radical la cual se obtuvo con el EC50 y el TEC50 y la eficiencia anti radical fue mejor en los tres extractos de la capitaneja que en el ácido ascórbico.

Tabla 5.- Capacidad antioxidante de los diferentes extractos de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) y del ácido ascórbico.

| Muestra | EC 50 mg/ml DPPH | TEC 50 minutos | EA (1/EC50)*(TEC 50) |
|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|
| Ácido ascórbico | 25 | 2 | 0.08 |
| Extracto acuoso | 9.1 | 0.1 | 0.010 |
| Extracto acetónico | 6.2 | 0.2 | 0.032 |
| Extracto alcohólico | 4.5 | 1 | 0.222 |

EC50: Concentración necesaria para disminuir el DPPH AL 50%, TEC50: Tiempo para reducir el DPPH a la mitad y EA: Eficiencia anti radical.

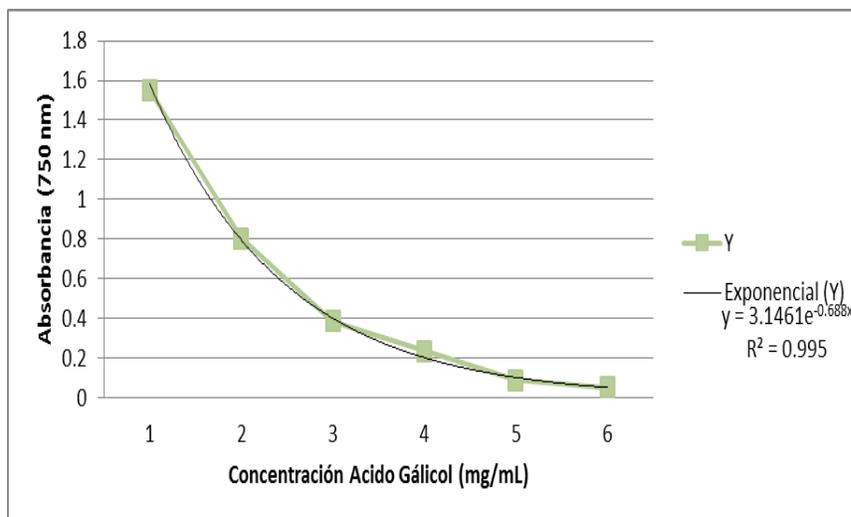
8.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos de extractos de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).

Se cuantificó la cantidad de fenoles, polifenoles y flavonoides del extracto acuoso, extracto acetónico y extracto alcohólico de capitaneja y los resultados obtenidos de la cantidad de fenoles de los diferentes extractos de capitaneja se muestran a continuación en la siguiente tabla 6 se muestran la cantidad de fenoles en los tres extracto de la planta en donde la mayor cantidad la posee el extracto acetónico. En la siguiente gráfica 12 se muestra la curva patrón realizada con ácido gálico.

Tabla 6. Cuantificación de fenoles en diferentes extractos de capitaneja.

| Extracto | Fenoles (mg de ácido gálico / mL) |
|------------|--------------------------------------|
| Acuoso | 93.21 ± 0.05 |
| Acetónico | 144.97 ± 0.02 |
| Alcohólico | 142.16 ± 0.05 |

(±) desviación estándar

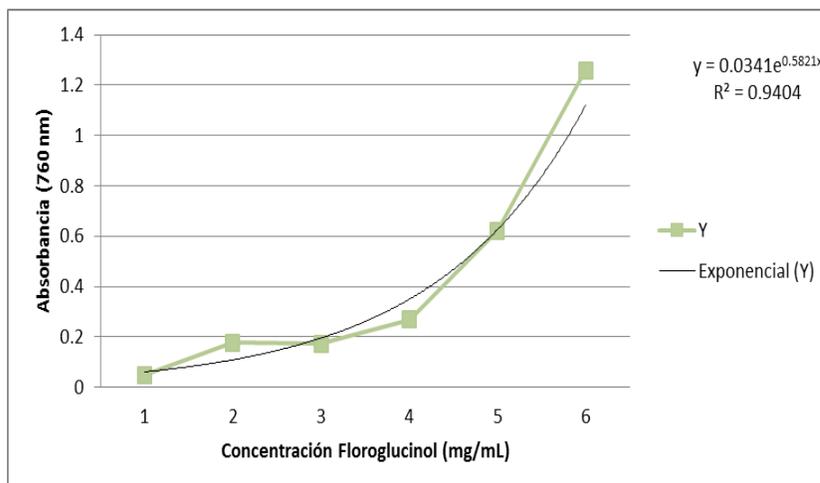


Gráfica 12. Curva patrón para la cuantificación de fenoles utilizando Ácido gálico.

A continuación en la tabla 7 se aprecian los resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles en diferentes extractos de capitaneja, donde el extracto acuoso es el que posee la mayor concentración de polifenoles con una cantidad de 311.16 ± 2.59 mg de fluoroglucinol/ml de extracto. En la gráfica 13 se muestra la curva patrón realizada con fluoroglucinol.

Tabla 7. Cuantificación de polifenoles en diferentes extractos de capitaneja

| Extracto | Polifenoles (mg de fluoroglucinol / mL) |
|-------------------|---|
| Acuoso | 311.16 ± 2.59 |
| Acetónico | 268.70 ± 3.03 |
| Alcohólico | 292.84 ± 0.04 |

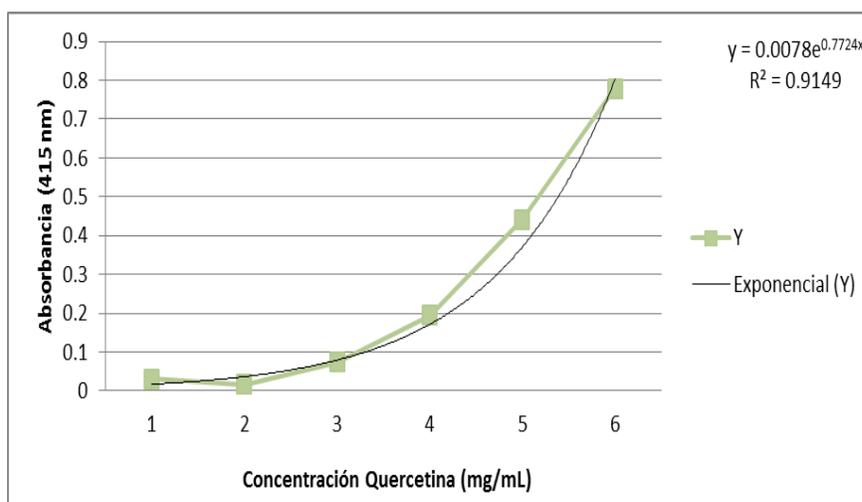


Gráfica 13. Curva patrón para la cuantificación de polifenoles utilizando utilizando fluoroglucinol.

En la tabla 8 se aprecia la cantidad de flavonoides de los diferentes extractos de capitaneja, y posteriormente en la gráfica 14 se muestra la curva patrón en la cual se utilizó quercetina. El extracto que contiene la mayor concentración de flavonoides fue el extracto acuoso con la cantidad de 37.96 ± 2.2 mg de quercetina/ml.

Tabla 8. Cuantificación de flavonoides en diferentes extractos de capitaneja.

| Extracto | Flavonoides (mg de quercetina/ mL) |
|-------------------|---------------------------------------|
| Acuoso | 37.96 ± 2.2 |
| Acetónico | 23.95 ± 3.5 |
| Alcohólico | 18.37 ± 0.55 |



Gráfica 14. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides utilizando quercetina.

8.3. Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)

En la tabla 9 se aprecia la concentración de proteínas a través del método de Bradford.

Tabla 9. Concentración de proteína en el extracto acuoso de la capitaneja

| Extracto | Bradford |
|---------------|-------------------|
| | mg de proteína/mL |
| Acuoso | 0.92 mg/mL |

8.4. Cuantificación de carbohidratos reductores

8.4.1. Método de Benedict

En los resultados usando este método se muestran la cantidad de carbohidratos reductores (tabla 10), en donde se aprecia que la planta posee carbohidratos reductores en una cantidad de 36.04 miligramos de carbohidratos reductores por mililitro de extracto.

Tabla 10. Concentración de carbohidratos reductores en la capitaneja por el método de Benedict

| Contenido de carbohidratos reductores | |
|--|-------------|
| Método de Benedict | 36.04 mg/mL |

8.4.2. Método de Dubois (Fenol-sulfúrico)

A continuación en la tabla 11 se muestran el contenido total de pentosas (ribosa y fucosa) y hexosas (glucosa y fructosa) de la capitaneja en donde se observa que la planta posee mayor cantidad de pentosas que de hexosas.

Tabla 11. Concentración de hexosas y pentosas en la capitaneja por el método de Dubois

| Contenido de carbohidratos reductores por el método de Dubois | |
|--|-------------|
| Hexosas | 3.114 mg/mL |
| Pentosas | 6.632 mg/mL |

8.4.3. Método de Fehling

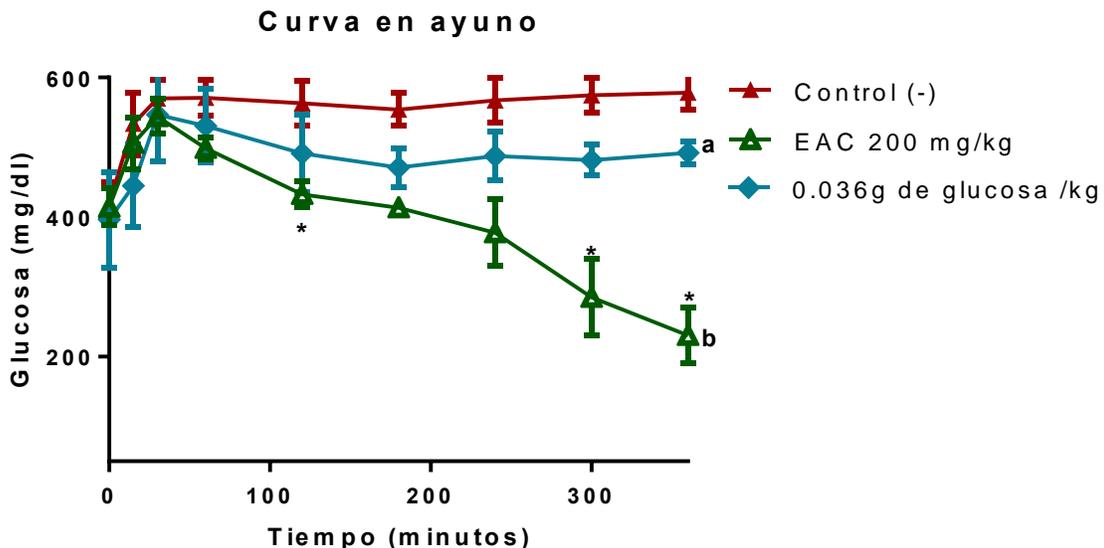
A continuación en la tabla 12 se observan los resultados obtenidos a través del método de Fehling en donde se muestra la cantidad total de carbohidratos reductores muy similar a la obtenida con el método de Benedict.

Tabla 12. Concentración de carbohidratos reductores en la capitaneja por el método de Fehling

| Contenido de carbohidratos reductores | |
|---------------------------------------|------------|
| Método de Fehling | 37.44 g/mL |

8.4.4. Curva de glucosa en ayuno con extracto acuoso de capitaneja y glucosa

En la gráfica 15 se muestra una curva de glucosa en ayuno en donde se utilizó a un grupo de ratas hiperglucémicas se les administró la cantidad de glucosa que posee 200 mg de capitaneja, y al otro grupo se le administró la dosis de 200 mg de capitaneja. Se puede observar que a los 30 minutos posteriores a la administración hay una elevación de glucosa, en el grupo al cuál se le administró únicamente la glucosa, los niveles de glucosa se mantienen elevados, por otro lado al grupo al que se le administró la capitaneja después del minuto 30 los niveles circulantes de glucosa disminuyen notablemente.



Grafica 15.- Curva de glucosa en ayuno con la dosis de 200 mg/kg de EAC y 0.036 g/kg de glucosa en ratas hiperglucémicas. Los resultados muestran los promedios de

cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6) y la desviación estándar (\pm) de ambos grupos.

(a y b) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante la prueba de T de Student con una p significativa ≤ 0.05 .

Un área bajo la curva: Control (-) = 100%, EAC 200 mg/kg = 70.50%, 0.036 g/kg de glucosa = 87.11%.

8.5. Administración crónica

A continuación se muestran los resultados de los parámetros medidos semanalmente durante el periodo experimental.

8.5.1. Peso de los animales durante la administración crónica

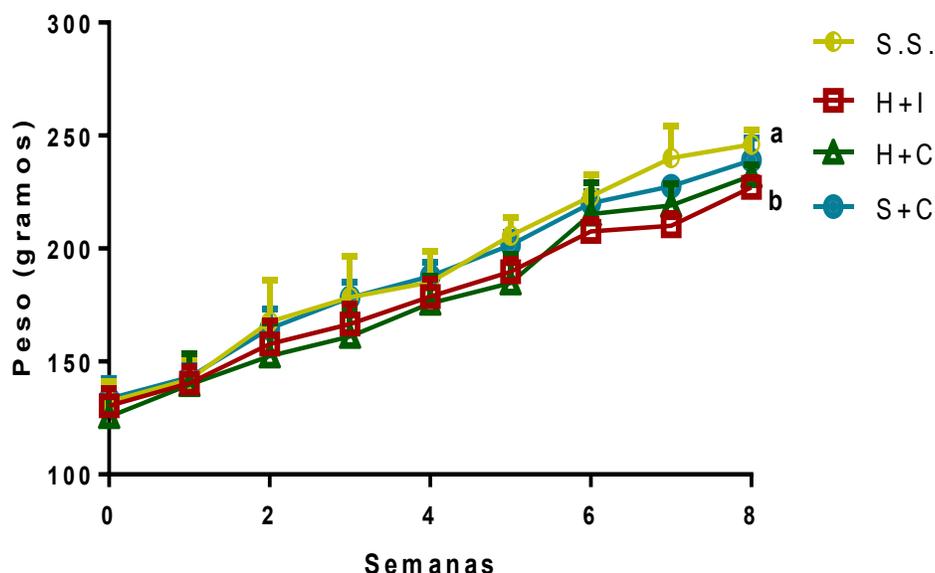
Durante la administración crónica se monitoreó el peso corporal de los animales de experimentación de los 4 grupos durante las 8 semanas, en la tabla 13 se muestran los promedios de los pesos en gramos de todos los grupos, se observa que hubo un aumento de peso en todos los grupos y en la gráfica 16 se muestran los mismos resultados en gráfica.

Tabla 13. Pesos de los animales durante la administración crónica.

| | Inicio | Semana 1 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Semana 6 | Semana 7 | Semana 8 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Grupo I | 132.2 \pm 9.0 | 142.1 \pm 9.2 | 167.5 \pm 8.5 | 178.4 \pm 18.2 | 185 \pm 13.6 | 205.7 \pm 8.1 | 223 \pm 9.5 | 240 \pm 14.1 | 246.5 \pm 6.3 |
| Grupo II | 130.4 \pm 7.6 | 140.4 \pm 7.5 | 157.7 \pm 9.1 | 166.5 \pm 8.6 | 178.8 \pm 7.6 | 189.7 \pm 5.6 | 207.5 \pm 5.4 | 210 \pm 5.6 | 227 \pm 4.2 |
| Grupo III | 125.5 \pm 9.9 | 139.8 \pm 9.8 | 152.4 \pm 4.6 | 161.1 \pm 11.2 | 175.8 \pm 9.8 | 184.7 \pm 12.8 | 215.2 \pm 14 | 219 \pm 9.8 | 232.2 \pm 4.9 |
| Grupo IV | 133.5 \pm 8.7 | 143 \pm 7.8 | 164.5 \pm 8.8 | 178.2 \pm 7.0 | 187.8 \pm 6.3 | 201.5 \pm 5.5 | 220 \pm 5.0 | 227.5 \pm 3.5 | 239 \pm 9.8 |

\pm Error estándar

Administración crónica



Grafica 16.- Pesos de los animales durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo ($n=3$) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (a y b) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

8.5.2. Concentraciones de glucosa circulante en la administración crónica

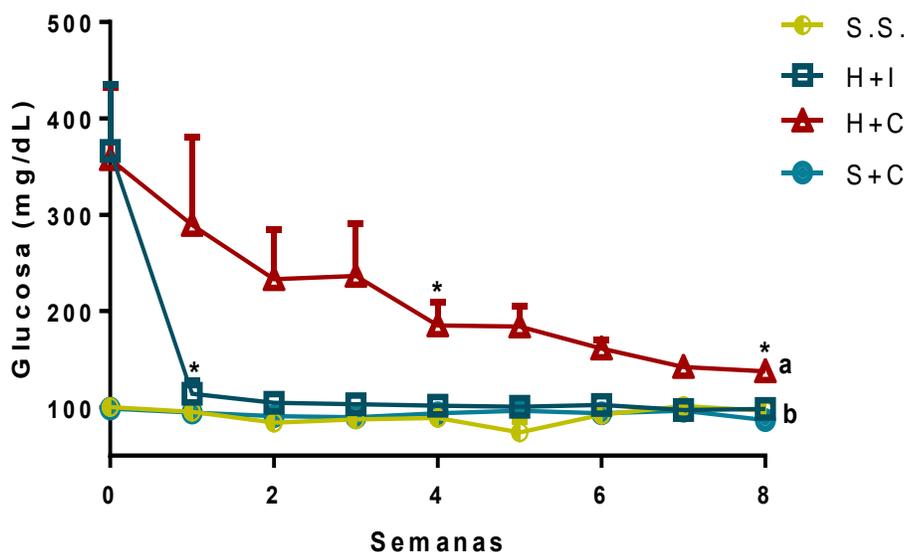
En la tabla 14 se muestran las concentraciones de glucosa circulante durante la administración crónica y se observa que en todos los grupos los niveles de glucosa fueron disminuyendo al paso de las semanas, en el grupo 3 fue menos notorio sin embargo esta disminuyó y a final del periodo experimental llego casi a concentraciones normales de glucosa circulante.

En la gráfica 17 se muestran los mismos resultados.

Tabla 14. Concentraciones de glucosa circulante durante la administración crónica.

| | Inicio | Semana 1 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 | Semana 5 | Semana 6 | Semana 7 | Semana 8 |
|------------------|--------------|-------------|------------|------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Grupo I | 100.4± 8.4 | 95.4±6.0 | 84.3±9.3 | 87.6±7.4 | 89.2±9.7 | 74.2±20.0 | 92.5±5.8 | 101.5±3.5 | 96.5±6.3 |
| Grupo II | 366.2± 120.3 | 114.2± 22.9 | 104.8±11.3 | 103.28±6.5 | 102±4.1 | 100.75±4.1 | 102.5±7.2 | 97.5±4.9 | 98.5±13.4 |
| Grupo III | 357.6± 129.9 | 289.5±158.6 | 233±89.5 | 236.6±94.9 | 185±41.9 | 184.±37.2 | 161±16.5 | 142±4.2 | 137.5±9.1 |
| Grupo IV | 99.1± 9.8 | 94.7± 11.2 | 91.1±10.4 | 89.8±7.0 | 94.2±8.6 | 96.7±4.7 | 94.2±6.1 | 96.5±6.3 | 87±11.3 |

Administración crónica



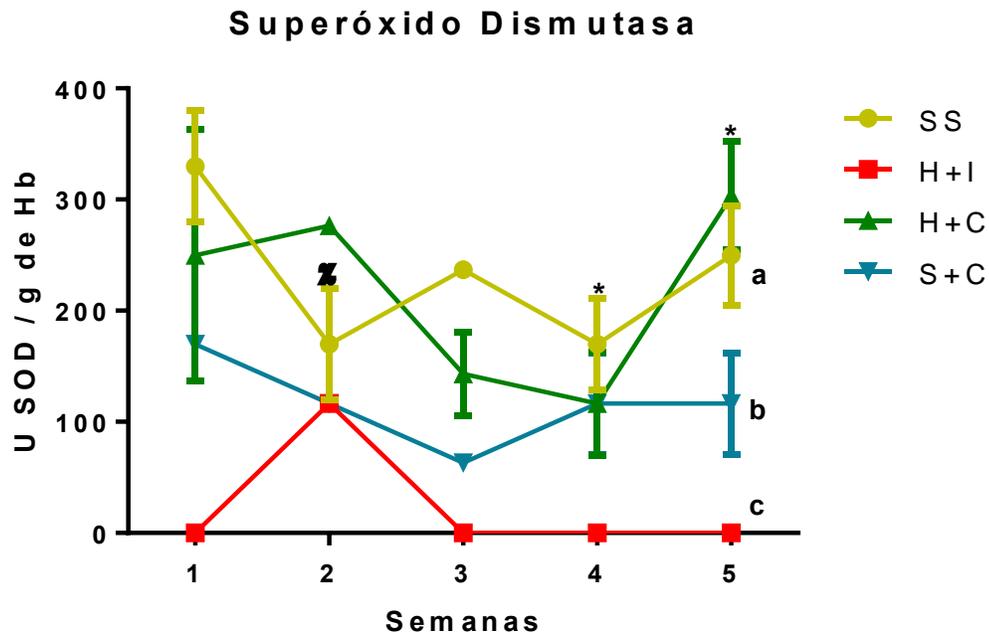
Gráfica 17.- Concentraciones de glucosa circulante durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (±) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (a y b) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$

8.6. Determinación de la actividad enzimática

8.6.1. Concentración de la superóxido dismutasa

A continuación en la gráfica 18 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa donde se observa que en el grupo 1 (sanas con solución salina) los niveles de la SOD se mantuvieron en niveles por encima de los 150 U de SOD / g de Hb durante todo el periodo experimental, cosa similar sucedió con el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja en donde también se mantuvieron visibles los niveles durante el periodo experimental, a diferencia del grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina que a partir de la tercer semana los niveles de la enzima no se detectaron.

Por último en el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja los niveles se mantuvieron visibles durante todo el periodo experimental y donde no se encontró diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de sanas con solución salina.

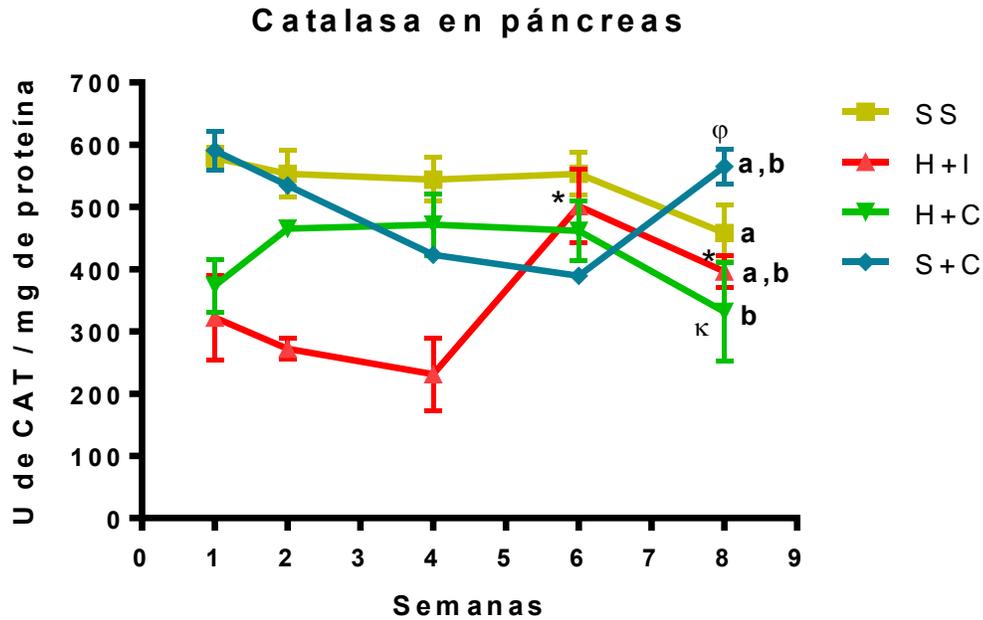


Grafica 18. Concentración de superóxido dismutasa en la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (* y ϕ) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a y b) indica diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

8.6.2 Concentración de la catalasa

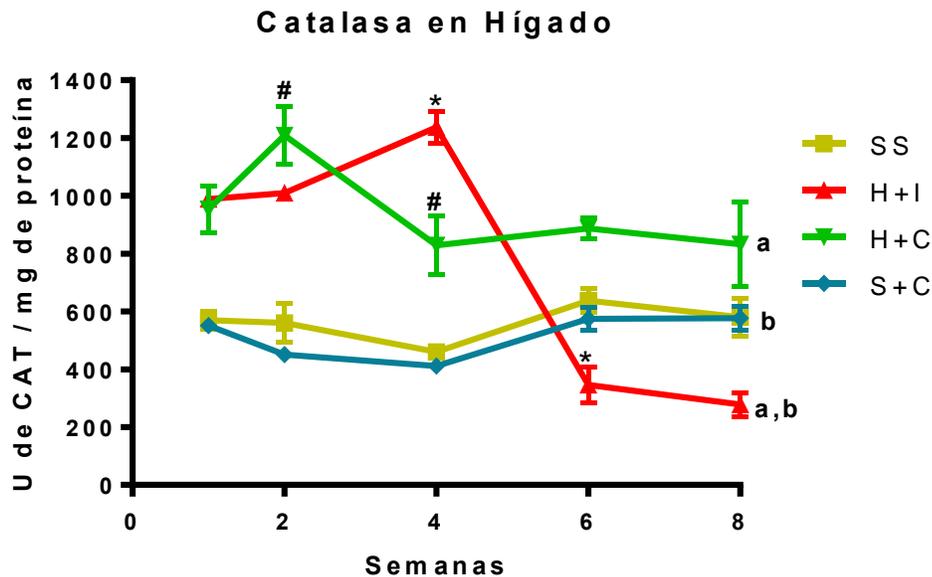
Se realizó la determinación de la enzima catalasa en diferentes tejidos extraídos de animales de cada grupo semanalmente.

A continuación en la gráfica 19 se muestran los resultados obtenidos de la cantidad de catalasa en páncreas en donde se observa que en el grupo de sanas con solución salina no hubo diferencia significativa al compararlos con todos los grupos excepto con el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja.



Gráfica 19.- Concentración de catalasa en páncreas durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, los diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (SC). (* y ϕ) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

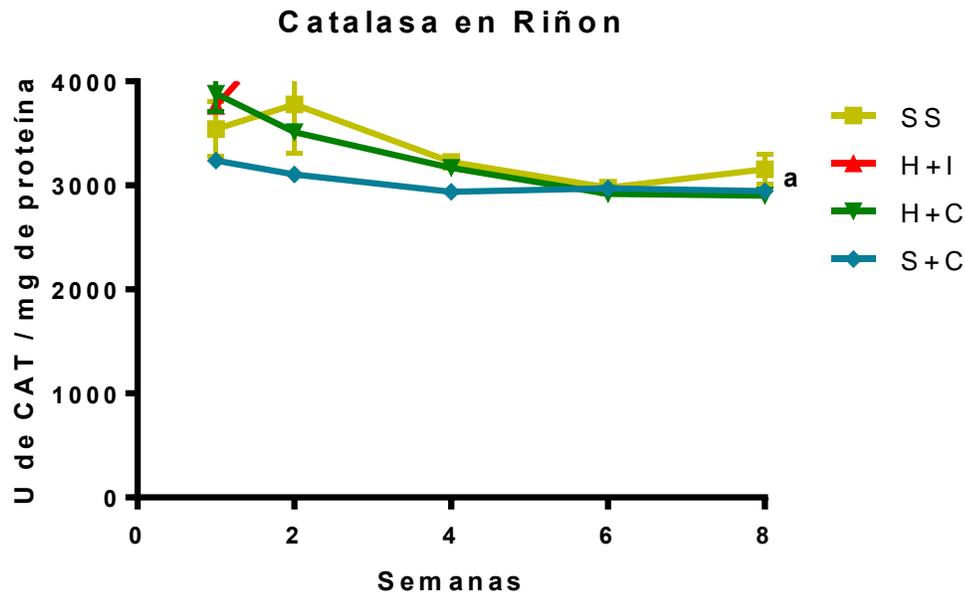
A continuación en la gráfica 20 se muestran las concentraciones de catalasa en hígado en el cual se observa que no hubo diferencia significativa entre el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina y el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja sin embargo no se encontró diferencia entre el grupo de ratas hiperglucémicas y el grupo de ratas sanas con administración de solución salina ni el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja.



Gráfica 20.- Concentración de catalasa en hígado durante la administración crónica.

Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (SC). (*) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

Por último se muestra en la gráfica 22 los resultados de las concentraciones de catalasa en riñón en donde no se encontró diferencia significativa en ninguno de los 4 grupos, excepto cuando se comparó el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina y el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja.



Gráfica 21.- Concentración de catalasa en riñón durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (SC). (*) Muestra la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

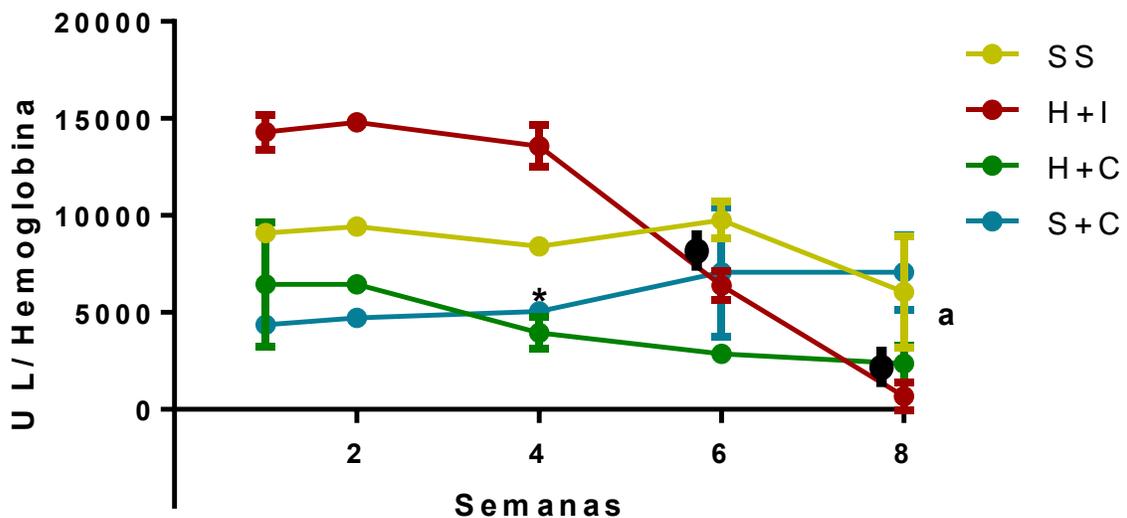
8.6.3 Concentración de la glutatión peroxidasa (Gpx)

En la gráfica 22 se muestran los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones de la enzima glutatión peroxidasa monitoreada durante las 8 semanas del periodo experimental y donde se observa que los niveles de la enzima en el grupo de ratas sanas con administración de solución salina se mantuvieron en niveles de 6000 a 8000 unidades durante todo el periodo experimental y donde no hubo diferencia significativa entre las diferentes semanas, posteriormente podemos observar que el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina los niveles de la enzima comienzan muy elevados (15,000 unidades) y a partir de la

semana 6 esta disminuye drásticamente hasta lograr niveles por debajo de las 1,000 unidades, mostrando diferencia significativa a partir de la sexta semana.

El grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja se observa que los niveles de la enzima comienzan muy elevados y posteriormente disminuyen a la cuarta semana de administración y estos se mantienen hasta la octava semana, mediante un análisis de varianza, no se encontró ninguna diferencia cuando se comparó con el grupo de ratas sanas.

Glutación Peroxidasa

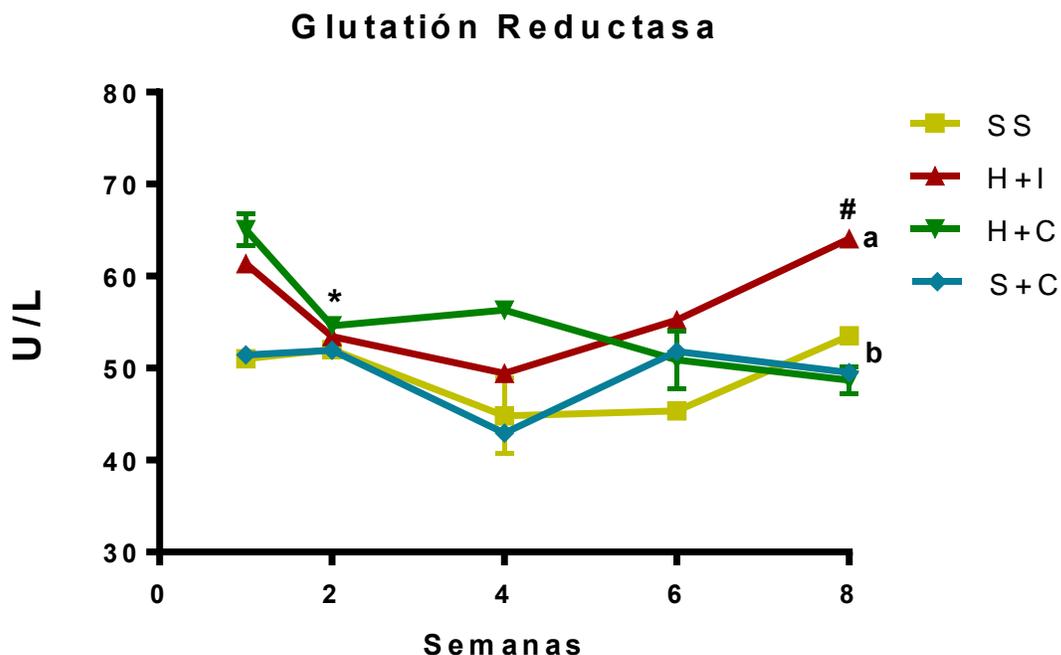


Gráfica 22.- Concentración de glutación peroxidasa durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo ($n=3$) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (SC). (*) Muestra la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

8.6.4 Concentración de la glutación reductasa (GR)

A continuación en la gráfica 23 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la glutación reductasa no se observó ninguna diferencia

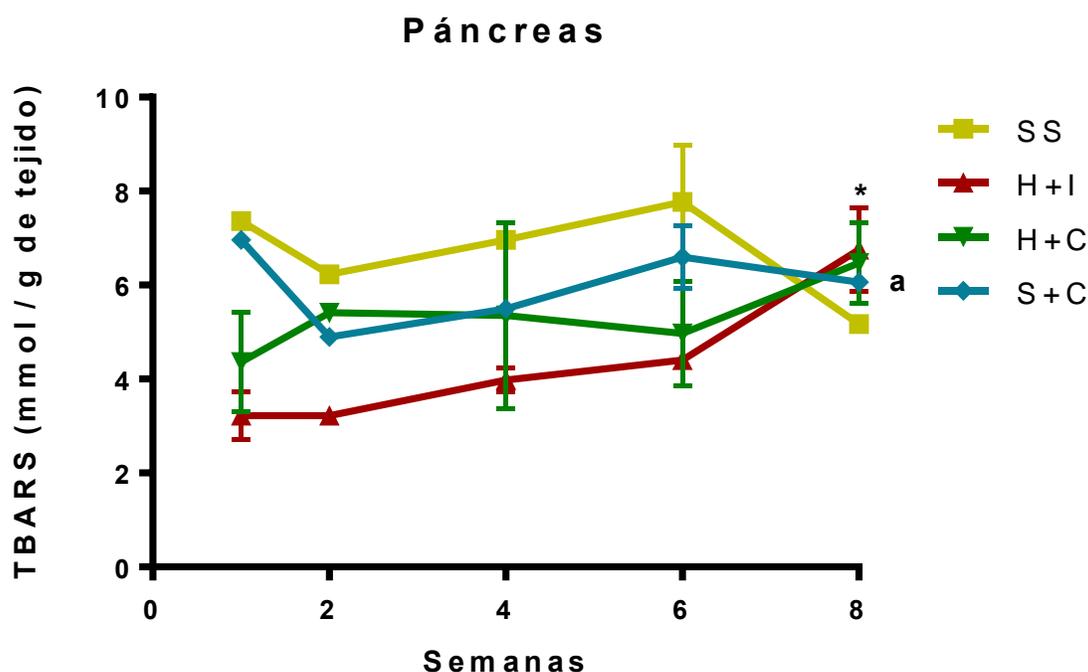
significativa cuando se comparó entre los diferentes grupos. Los niveles de la enzima se mantuvieron muy similares sin embargo cabe resaltar que el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina los niveles se elevaron a partir de la semana 6 en adelante mostrando diferencia significativa entre los niveles de la semana 6 a la semana 8, lo mismo sucedió con el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja donde al inicio de la experimentación los niveles de la enzima fueron los más elevados de todos los grupos sin embargo a partir de la semana 2 estos niveles se estabilizaron mostrando diferencia significativa cuando se comparó con la semana 1 y a partir de esa semana no hubo diferencia significativa.



Gráfica 23.- Concentración de la glutatión reductasa durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (SC). (*) Muestra la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

8.7. Grado de lipoperoxidación (Malondialdehído)

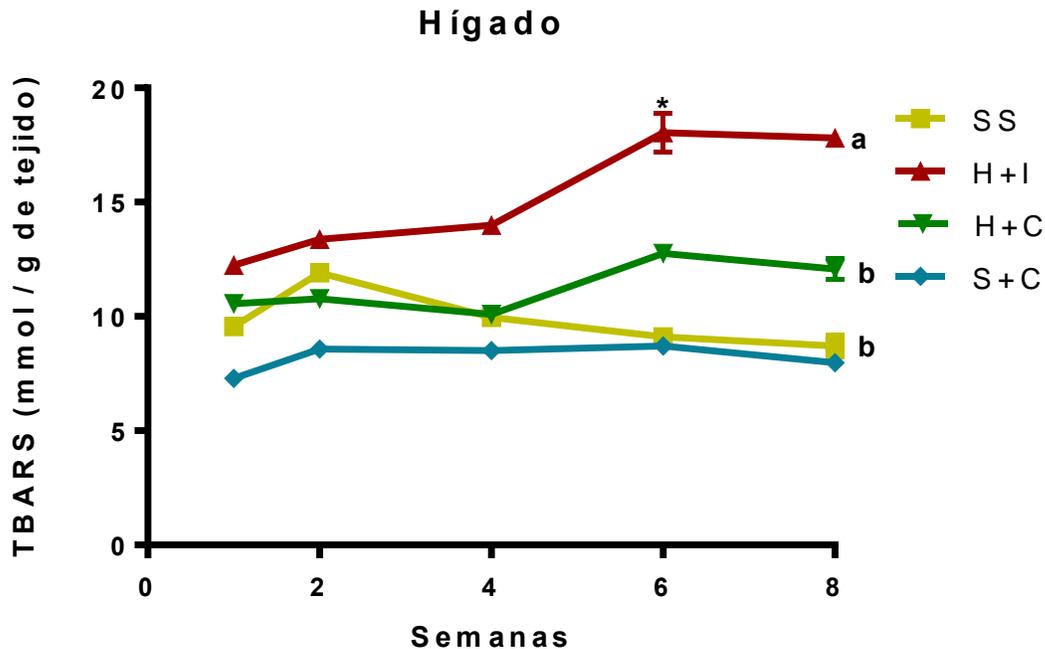
A continuación en la gráfica 24 se aprecian los resultados obtenidos del grado de lipoperoxidación en páncreas. Se puede apreciar que en el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina en la semana 2 sus niveles se elevaron más que en cualquier otro grupo, sin embargo no se encontró diferencia significativa en ninguno de los 4 grupos al compararlos



Gráfica 24.- Cuantificación de lipoperoxidación en páncreas durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo ($n=3$) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (*) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

El grado de lipoperoxidación en tejido hepático se muestran a continuación en la gráfica 25 donde se observa que el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina registró los niveles más elevados de MDA y fue significativamente diferente a todos los grupos, por otra parte el grupo de ratas

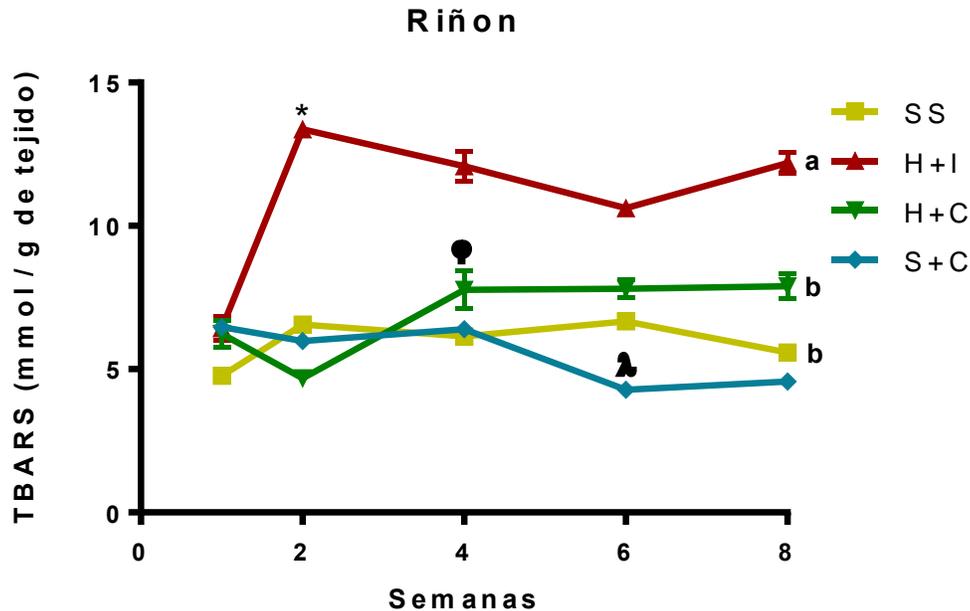
hiperglucémicas con administración de capitaneja registro niveles inferiores y no se encontró diferencia significativa entre este grupo y el grupo de ratas sanas con solución salina ni con el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja.



Gráfica 25.- Cuantificación de lipoperoxidación en hígado durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (*) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

Por último en la gráfica 26 se muestran los resultados del grado de lipoperoxidación en riñón en donde a pesar de que no hubo diferencia significativa entre los 4 grupos los niveles más elevados se encontraron en el grupo de ratas diabéticas con administración de insulina, por otro lado en el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja se registró una elevación en los niveles de MDA en la semana 2 los cuales se volvieron a normalizar a las 4 semanas de

administración de la capitaneja, sin embargo no hubo diferencia significativa entre este grupo y ninguno de los demás.

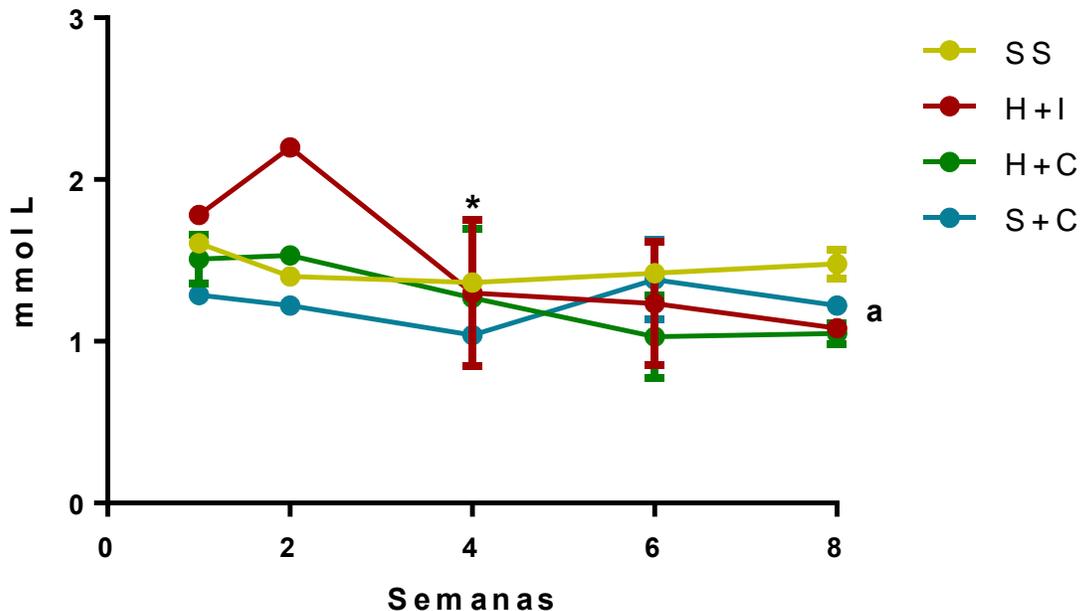


Gráfica 26.- Cuantificación de lipoperoxidación en riñon durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (*) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

8.8. Medición del estado antioxidante total (TAS)

A continuación en la gráfica 27 se muestran los resultados obtenidos de la medición del estado antioxidante total, en donde no hubo ninguna diferencia significativa entre los distintos grupos.

Estado Antioxidante Total



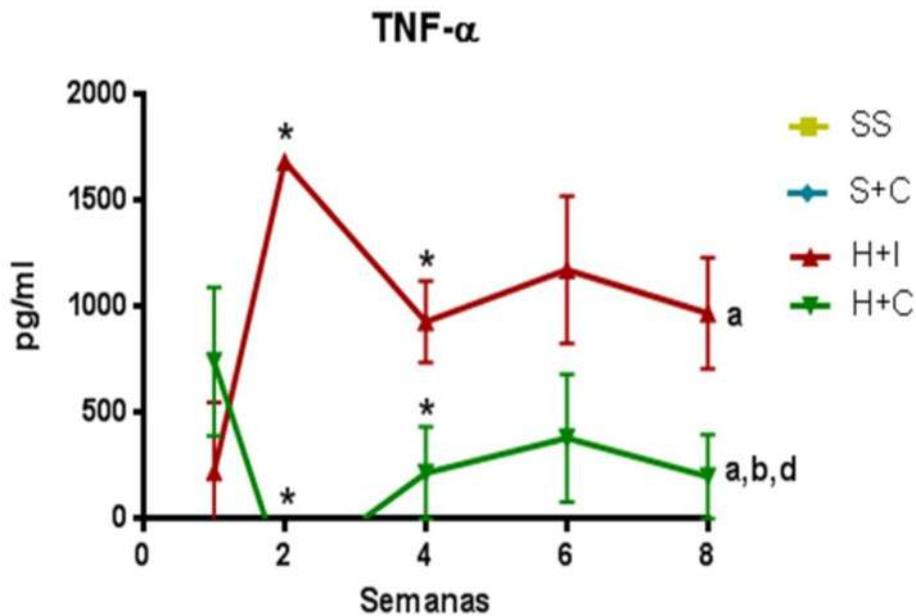
Gráfica 27.- Cuantificación del estado antioxidante total durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto crudo de capitaneja (SC). (*) Muestra la diferencia entre una semana y otra. (a y b) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

8.9. Cuantificación de citocinas proinflamatorias (TNF α -, IL-1 β e IL-6).

Para la realizar la cuantificación de las citocinas proinflamatorias (TNF α -, IL-1 β e IL-6) se extrajo sangre mediante punción cardiaca semanalmente y esta se almaceno a -70 °C hasta su posterior uso, las cuales se midieron por el método de ELISA tipo sándwich.

En la gráfica 28 se muestran los resultados de las concentraciones del factor de necrosis tumoral α de los 4 grupos de estudio en donde se observa que el grupo de

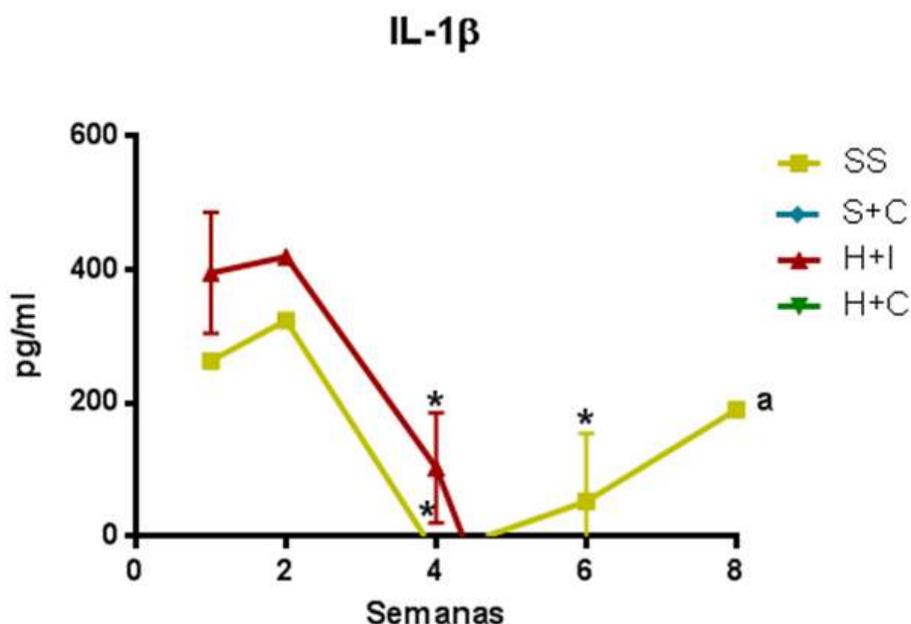
ratas hiperglucémicas fue el que registro niveles más elevados de esta citocina pro inflamatoria a partir de la semana 2 y se mantuvo elevada hasta finalizar la administración crónica, por otro lado en el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja a pesar de que no hubo diferencia significativa con el grupo al que se le administró insulina, los valores de TNF- α alfa fueron menores a partir de la semana 2 en adelante y no se encontró diferencia significativa con el grupo de ratas sanas con administración de solución salina. Por último los grupos sanas + solución salina y el grupo de sanas + administración de capitaneja no se detectó presencia de TNF- α en ningún momento de las 8 semanas de experimentación.



Gráfica 28.- Concentración de TNF- α circulante durante la administración crónica.

Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (*) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a, b, c y d) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

En la gráfica 29 se muestran los resultados de las concentraciones de IL-1 β y q se observa que no se detectó presencia de esta citosina en los grupos de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja y en el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja, por otro lado el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina se observaron niveles de alrededor de los 400 pg/ml en la semana uno, posteriormente estos niveles se mantuvieron en la semana 2 pero después de la semana 4 en adelante no se registraron niveles de IL-1 β , y en el grupo de ratas sanas con administración de solución salina, se registraron niveles inferiores del orden de los 300 pg/ml .

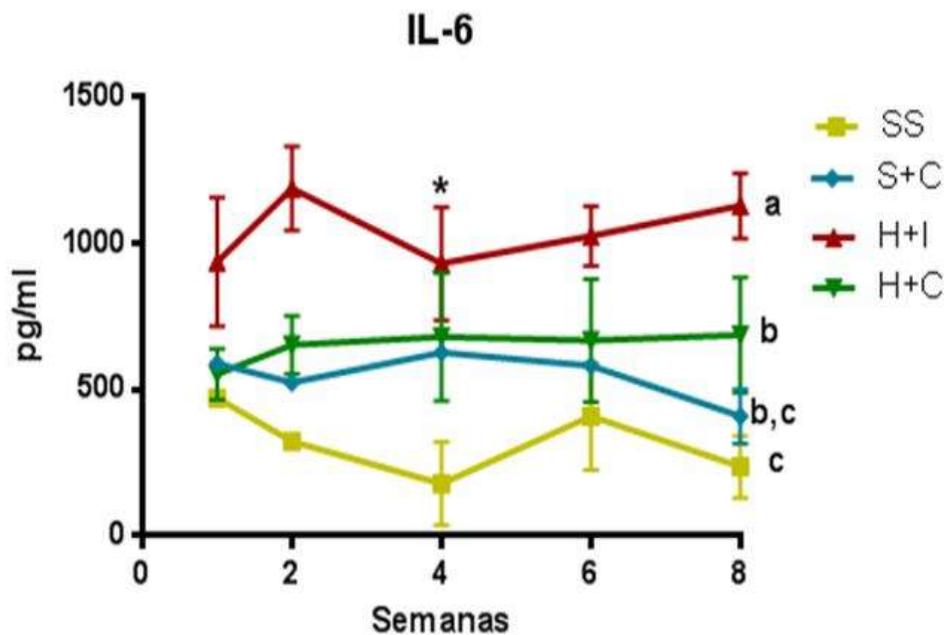


Gráfica 29.- Concentración de IL-1 β circulante durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (*) Indica la diferencia entre una semana y otra. (a, b, c y d) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

A continuación se muestran los niveles de las concentraciones circulantes de la IL-6 (gráfica 30) en donde se observa que los niveles más elevados se encontraron en

el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina registrando niveles incluso por arriba de los 1000 pg/ml. El grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja se registraron niveles inferiores a los 700 pg/ml durante todo el periodo experimental y sin diferencia significativa con el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja.

Por último el grupo de ratas sanas con administración de solución salina mostró los niveles más bajos de todos los grupos sin embargo no hubo diferencia significativa al compararlo con el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja.



Gráfica 30.- Concentración de IL-6 circulante durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios de cada grupo de un total de 3 animales por cada grupo (n=3) y la desviación estándar (\pm) de cada grupo, las diferentes grupos: ratas sanas con administración de solución salina (S.S.), ratas hiperglucémicas + insulina (H+I), ratas hiperglucémicas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (H+C) y ratas sanas + 200 mg/kg de extracto acuoso de capitaneja (SC). (*) Muestra la diferencia entre una semana y otra. (a, b, c y d) nos muestra la diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey considerando significativo $p \leq 0.05$.

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se estudió la actividad hipoglucemiante de diferentes extractos de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) así como también el efecto de está sobre el sistema inmunológico en ratas hiperglucémicas. Hasta el momento no existen reportes previos de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) por lo que los resultados presentados son de gran relevancia ya que el hecho de utilizar un producto fitoterapéutico no solo es más económico, sino que poseen menos efectos secundarios adversos, a su vez es de gran importancia el presente estudio ya que la diabetes es un problema de salud mundial, por una parte debilita los sistemas de salud al tratar a millones de personas con este padecimiento y por otra parte impacta en la calidad de vida de las personas que la padecen. También es preciso resaltar que en la actualidad esta planta se adquiere de manera muy fácil en los mercados de la ciudad y la gente la utiliza comúnmente para ayudar al tratamiento farmacológico en la diabetes sin embargo no existen reportes previos de estudios de la planta capitaneja (*Verbesina montanoifolia*). Por lo que en la presente investigación todos los aportes son de gran relevancia.

Para comenzar con la presente investigación se compró un lote de hojas de capitaneja (*verbessina montanoifolia*) en el mercado independencia ubicado en la ciudad de Morelia, Michoacán, México. Así mismo se recolectó la planta en el cerro del águila ya que en un estudio realizado en el año 2008 se sabía que dicha planta se encontraba dentro de la flora de ese lugar (Zacarías-Eslava y cols. 2008), posteriormente se herborizo el ejemplar y se llevó al herbario de la Universidad Nacional Autónoma de México para corroborar que se iba a trabajar con la especie que se deseaba. Una vez que se corroboró que el género y la especie de la planta comprada en el mercado era la misma a la recolectada en el cerro del Águila (Anexo 1) se comenzó con la preparación de los diferentes extractos de la capitaneja: El extracto acuoso de capitaneja se obtuvo homogeneizando las hojas con agua destilada, este es el modo de empleo más frecuente en la medicina

tradicional; El extracto acetónico se realizó mediante lavado con acetona pura la cual se removía cada semana, y mediante un proceso de destilación simple, se removía el solvente quedando los pigmentos acetónicos, en este extracto encontramos compuestos poco hidroxilados verde/amarillos clorofila (clorofila a, clorofila b), flavonoides (quercetina) y flavonoles (catequina); El extracto alcohólico se realizó posteriormente de la realización del extracto acetónico y en este extracto se encuentran compuestos altamente hidroxilados amarillos naranjas y rojos (fenoles y polifenoles). Y por último ya que se habían removido todos los pigmentos de la planta se obtuvo la fracción sin pigmentos (Hanhieva y cols 2010; Delgado y cols. 2014).

Para la inducción de la hiperglucemia se utilizó el fármaco aloxano, varios estudios experimentales han demostrado que el mecanismo de acción del aloxano provoca un aumento repentino en la secreción de insulina en presencia o ausencia de glucosa, la cual aparece justo después del tratamiento con aloxano, esta liberación de insulina inducida por aloxano, se produce por una corta duración seguida por la supresión completa de islotes de la respuesta a la glucosa, incluso cuando se utilizan altas concentraciones de glucosa. Además, la acción del aloxano en el páncreas está precedido por su rápida absorción por las células beta pancreáticas que han sido propuestos para ser una de las características importantes que determinan la diabetogenicidad del aloxano, así como una producción de especies reactivas de oxígeno. (Szkudelski, 2001; Rohilla A. y Ali S. 2012),

Como se describió anteriormente se realizó la curva de glucosa en ayuno y la curva de tolerancia a la glucosa utilizando diferentes dosis del extracto crudo de la capitaneja (80 160, 200, 250 y 300 mg/kg), encontrando que la dosis hipoglucemiante óptima fue la de 200 mg/kg de peso la cual demostró tener una efectividad del 44.4% en la curva de glucosa en ayuno y de 42.9% en la curva de tolerancia a la glucosa.

Previamente primero se probó el efecto hipoglucemiante de otra especie de capitaneja (*Verbesina crocata*) la cual no tuvo ningún efecto hipoglucemiante por lo cual se descartó y se decidió buscar otra especie que fue la que sí logró efecto hipoglucemiante.

Como se mencionó anteriormente en cada uno de los extracto obtenidos se encuentran compuestos diferentes es por eso que se realizó la estandarización de la dosis hipoglucemiante óptima usando extractos acetónicos en donde se logró un porcentaje de efectividad del 9.2% en la curva de glucosa en ayuno y del 21.4 % en la curva de tolerancia a la glucosa utilizando una dosis de 4 mg/kg.

Posteriormente se buscó la dosis hipoglucemiante óptima utilizando el extracto alcohólico en donde la mejor dosis fue la de 40 mg/kg que logró un porcentaje de efectividad del 4.1% solo en la curva de glucosa en ayuno cuando. Por último cuando se utilizó la fracción sin pigmentos para encontrar la dosis hipoglucemiante se encontró que la dosis de 500 mg/kg fue la más efectiva logrando un porcentaje de efectividad del 5.8% en la curva de glucosa en ayuno y del 8.0% en la curva de tolerancia a la glucosa.

Por lo anterior, se corrobora que la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee efecto hipoglucemiante y que el extracto crudo a una dosis de 200 mg / kg posee el mayor porcentaje de efectividad.

En un estudio realizado por Coman y colaboradores en el año 2012 reportaron que existen más de 1000 plantas utilizadas alrededor del mundo para el tratamiento de la diabetes. Estas poseen un gran número de compuestos bioactivos con efectos antidiabéticos, en la mayoría de los casos no se conoce el mecanismo de acción de estas plantas pero se han realizado muchas investigaciones con el fin de conocer el mecanismo de acción (Coman C y cols. 2012)

En la gráfica 3 se muestran los resultados de la comparación del efecto hipoglucemiante de la capitaneja comprada en el mercado y de la capitaneja

recolectada, las cuales no tuvieron diferencia significativa cuando se les comparó estadísticamente, este dato es de suma importancia ya que nos indica que las personas no deben ir y recolectar la planta en el lugar en donde se encuentre sino puede ir al mercado y adquirirla de una manera más práctica.

Una vez que se encontró la dosis hipoglucemiante óptima se pasó a la realización de la administración crónica la cual tuvo una duración de 8 semanas y en donde se monitoreo semanalmente la concentración de glucosa circulante donde los resultados obtenidos se pueden apreciar en la gráfica 16 y se observa que en los 4 grupos la glucosa disminuyo semanalmente, en el grupo 2 el cual eran las ratas hiperglucémicas con el extracto de la planta, si bien al final del estudio las concentraciones no lograron llegar a niveles normales de glucosa, este fue disminuyendo semanalmente, cabe resaltar que ninguno de los animales de experimentación de ningún grupo murió durante el periodo experimental.

Otro de los parámetros monitoreados semanalmente fue el peso y se observó que ninguno de los 4 grupos estudiados tuvo descenso del peso durante el periodo experimental (Gráfica 15), el grupo de ratas hiperglucémicas con administración del extracto de la capitaneja logró tener un aumento gradual cada semana durante el experimento, esto es un excelente dato ya que corrobora que el extracto tenía un efecto protector ya que en cuadros clínicos de diabetes uno de los síntomas más comunes es la pérdida de peso (Franz MJ y cols. 2007).

En el grupo de ratas sanas a las cuales se les administró el extracto también observamos un aumento gradual del peso, con lo que pudimos constatar que el extracto no impacta en el peso de un animal sano tras la administración crónica (Gráfica 15).

Al momento de la realización de las curvas de glucosa en ayuno se observó que en los primeros minutos tras la administración de los diferentes extractos de la planta había un ascenso en los niveles de glucosa circulante por lo cual se procedió a la

cuantificación de carbohidratos del extractos crudo de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) mediante tres diferentes métodos: Los dos primeros métodos fueron el método de Benedict y el método de Fehling ambos métodos son empleados para el contenido de carbohidratos reductores en muestras, una vez que se realizó el conteo se observó que mediante ambos métodos se encontró la presencia de carbohidratos reductores muy similares: A través del método de Fehling un total de 37.44 mg/mL (Tabla 12) de extracto el cual se puede apreciar en la tabla 12 y un total de 36.04 mg/ML a través del método de Benedict. (Tabla 10).

Posteriormente se realizó el método de Dubois (1956) con la finalidad de conocer la cantidad de carbohidratos principalmente hexosas (glucosa y fructosa) y pentosas (fucosa y ribosa) del extracto crudo de la capitaneja, encontrando que dicho extracto posee más cantidad de pentosas que de hexosas dichos resultados se pueden apreciar en la tabla 11. Este método es fácil y usado comúnmente en el estudio de plantas para conocer la cantidad de carbohidratos reductores (Chow P y Landhäuser S, 2004)

Estos datos fueron de suma importancia ya que de esta manera pudimos corroborar que el aumento en las concentraciones de glucosa que aparecían en los primeros minutos tras la administración del extracto crudo tanto en la curva de tolerancia a la glucosa como en la curva de glucosa en ayuno se debía a la presencia de carbohidratos reductores en el extracto que se estaba empleando (Gráfica 14).

También se descubrió la presencia de proteínas en el extracto crudo de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) mediante el método de Bradford en donde se encontró que el extracto crudo posee 0.92 mg/mL el cual se puede observar en la tabla 9).

Posteriormente se midió la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto crudo, el extracto acetónico y el extracto alcohólico de la capitaneja a través del método de Brand Williams 1995, en el cual se utiliza el reactivo DPPH, este método es fácil, rápido y barato, además de ser ampliamente utilizado para investigar las propiedades antioxidantes de alimentos (Kedare B y Singh P, 2011). En la gráfica 10 y en la tabla 5 se puede apreciar que los tres extractos poseen actividad antioxidante incluso reaccionaron de manera más rápidamente que con el ácido ascórbico el cual es un antioxidante por excelencia (Brand Williams 1995), sin embargo al realizar el análisis estadístico no se observó diferencia significativa entre el extracto y el ácido ascórbico con lo cual se concluyó que la planta poseía actividad antioxidante *in vitro*.

Una vez que se descubrió del efecto antioxidante *in vitro* (Brand Williams, 1995) se pasó a cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos de la planta, por lo que se inició cuantificando la cantidad de fenoles encontrando que los tres extractos poseen fenoles. El extracto acetónico es el que posee mayor cantidad de estos compuestos con $144,97 \pm 0,02$ mg de ácido gálico por mililitro de extracto, seguido por el extracto alcohólico con 142.16 ± 0.05 mg de ácido gálico por mililitro de extracto y por último el extracto crudo con una cantidad de 93.21 ± 0.05 mg de ácido gálico por mililitro de extracto (Tabla 6).

Una vez concluido lo anterior se pasó a cuantificar el contenido de polifenoles y fue el extracto acuoso el que contiene la mayor cantidad de estos compuestos con $311,16 \pm 2,59$ mg de fluoroglucinol por ml de extracto, seguido por el extracto alcohólico con 292.84 ± 0.04 mg de fluoroglucinol por ml de extracto y por último el extracto acetónico con 268.70 ± 3.03 mg de fluoroglucinol por ml de extracto (Tabla 7).

Por último se realizó la cuantificación de flavonoides y de nueva cuenta el extracto acuoso resultó con la cantidad más elevada de estos compuestos con $37,96 \pm 2,2$ mg de quercetina por ml de extracto seguido del extracto acetónico con 23.95 ± 3.5

mg de quercetina por ml de extracto y por último el extracto alcohólico con 18.37 ± 0.55 mg de quercetina por mL de extracto (Tabla 8).

Por lo anterior podemos asegurar que la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee una alta concentración de polifenoles y estos pueden ser lo posibles responsables de la capacidad antioxidante. Es importante mencionar que aparte de ser compuestos con poder antioxidante, diversos estudios corroboran que los fenoles son compuestos fotoquímicos que poseen propiedades antidiabéticas (Phoobo S y cols. 2013), a su vez los polifenoles se les ha relacionado no solo con poseer efecto antidiabético (Coman C y cols 2012) sino contra ciertos tipos de cáncer, hipertensión, asma entre otras patologías (Bhooshan P e Ibrahim R 2009). Otro estudio reporta que los polifenoles contrarrestan la resistencia a la insulina y por consiguiente se puede considerar una terapia para los pacientes con diabetes tipo 2 gracias a sus capacidades antioxidantes y sus propiedades antiinflamatorias (Mirsky N 2012)

Posteriormente se pasó a medir la capacidad antioxidante *in vivo* de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*), en donde se midieron enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa.

Se midió la catalasa primeramente en páncreas (gráfica 18) donde se observó que el grupo de ratas hiperglucémicas mantuvo concentraciones por debajo del grupo de ratas sanas con solución salina y a pesar de que estas fueron diferentes significativamente no se encontró ninguna diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja ni con el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina.

Posteriormente se midió catalasa en hígado (Gráfica 19) en donde el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja y el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina no tuvieron diferencia significativa sin embargo ambos grupos si fueron diferentes significativamente a los grupos de

ratas sanas. Sin embargo cabe resaltar que a partir de la semana 6 de tratamiento la enzima disminuye drásticamente los niveles en el grupo de ratas tratadas con insulina y en el grupo de ratas tratadas con capitaneja los niveles se mantuvieron en niveles más elevados, este indicador es muy importante ya que en pacientes con diabetes mellitus se ha reportado que los niveles de esta enzima son inferiores a los de un paciente sano (Danay H y cols 2014; Clápes H y cols 2006)

Por último se midió la enzima catalasa en riñón (Gráfica 20) en donde no se encontró diferencia significativa cuando se comparó al grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja contra el grupo de ratas sanas con administración de solución salina, este dato nos indica que el extracto crudo protege a la enzima catalasa, la cual es un antioxidante primario que ayuda a combatir el aumento en el estrés oxidativo ya que se sabe que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes como un mecanismo de defensa contra las especies reactivas de oxígeno, los sistemas de defensa antioxidantes intracelulares juegan un papel muy importante, cuando existe un aumento en el estrés oxidativo puede ocurrir un desbalance en las enzimas antioxidantes lo que conlleva al desarrollo de diversas complicaciones ya que las especies reactivas de oxígeno son la pieza clave para que esto se lleve a cabo, en condiciones como la diabetes existe un desbalance en las concentraciones de estas enzimas debido al aumento en el estrés oxidativo (Qujeq D y Rezvani T, 2007).

Posteriormente se pasó a medir la cuantificación de la enzima glutatión peroxidasa (Gpx) cuyos resultados se presentan en la gráfica 21, y donde al hacer un análisis de varianza no se encontró diferencia significativa entre los diferentes grupos sin embargo cabe resaltar que los niveles de glutatión peroxidasa en el grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con insulina disminuyeron sus niveles a partir de la semana 6 y al concluir el estudio fue el grupo que tuvo una menor cantidad de esta enzima, a diferencia de las ratas hiperglucémicas tratadas con capitaneja, ya que estas mantuvieron niveles más elevados al finalizar el estudio. Esto concuerda con

una investigación realizada por Guerra y colaboradores en el año 2005 en donde observaron que los niveles de esta enzima en pacientes diabéticos controlados y pacientes diabéticos no controlados era muy inferiores en comparación de pacientes sanos, mismas que son un reflejo del aumento en las especies reactivas de oxígeno las cuales desgastan los niveles de la enzima (Guerra y cols. 2005; Jandric-Balen y cols. 2005)

Posteriormente se midió la enzima glutatión reductasa (Gráfica 22), donde se puede observar que al hacer las comparaciones entre los diferentes grupos, el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de capitaneja no tuvo diferencia significativa cuando se comparó mediante un análisis de varianza contra los grupos de ratas sanas, a diferencia del grupo de ratas hiperglucémicas en donde sí tuvo diferencia significativa cuando se comparó con los demás grupos. Cabe resaltar que los niveles de la enzima en este grupo se elevaron a partir de la semana 6 en adelante, de acuerdo a resultados obtenidos por Taheri y colaboradores en el año 2012, observaron que precisamente los niveles de esta enzima aumentan debido al deterioro de los radicales libres generados durante el desarrollo de la diabetes (Taheri E y cols. 2005).

Se midió la cantidad de la enzima superóxido dismutasa en donde los resultados que se observan en la gráfica 17 muestran que no hubo diferencia significativa entre el grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con capitaneja y el grupo de ratas sanas tratadas con solución salina, otro dato que es de resaltar es que a partir de la semana 3 en adelante los niveles de la enzima no se detectaron en el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina, en diversos estudios muestra que en pacientes diabéticos la enzima superóxido dismutasa disminuye notablemente como consecuencia del aumento en las especies reactivas de oxígeno (Guerra y cols 2005)

Otra forma de medir la capacidad antioxidante *in vivo* es realizarlo es mediante la cuantificación del malondialdehído, el cual es uno de los métodos más

comúnmente utilizados el cual se basa en la reacción del tiobarbitúrico con el malondialdehído, producto este del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Su análisis es usado por su buena practicabilidad y sencillez (Pérez G y Pérez A, 2009).

Primero se realizó la medición de malondialdehído en páncreas en donde los resultados se pueden apreciar en la gráfica 23 y se observa que a pesar de que no hubo diferencia significativa cuando se compararon los 4 grupos las concentraciones más elevadas se registraron en la semana dos en el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina, esto concuerda con estudio realizado por Rakesh K y colaboradores en el año 1999 donde midieron el nivel de lipoperoxidacion en ratas diabéticas y encontraron que los niveles de MDA en ratas diabéticas es mayor que en condiciones fisiológicas normales (Rakesh K y cols. 1999).

Posteriormente se midió la cantidad de malondialdehído en hígado (Gráfica 24) en donde se encontró que el grupo de ratas hiperglucémicas administradas con extracto crudo de capitaneja tuvo valores muy similares al grupo de ratas sanas administradas con solución salina y al de grupo de ratas sanas con administración de capitaneja, al realizar los análisis estadísticos se encontró que no hubo diferencia significativa entre dichos grupos pero si hubo diferencia significativa con el grupo de ratas hiperglucémicas con administración de insulina.

Por último se midió la cantidad de malondialdehído en riñón (Gráfica 25) en el cual al realizar los análisis estadísticos no hubo diferencia significativa entre los 4 grupos de estudio.

Por lo que se puede afirmar que el extracto de capitaneja tiene efecto antioxidante *in vivo* ya que los niveles de malondialdehído medidos en tejidos nunca fueron diferentes significativamente a los grupos de ratas sanas, y estos se mantuvieron por niveles inferiores a los del grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con insulina,

esto concuerda con la literatura ya que pacientes con diabetes mellitus existe un aumento en el estrés oxidativo lo que trae como resultado niveles de malondialdehído mayores que en condiciones fisiológicas normales (Licea Piug 2003).

Por ultimo para concluir con la medición de los diferentes parámetros para medir la capacidad antioxidante *in vivo* se procedió a medir el estado antioxidante total en donde no hubo diferencia significativa entre los diferentes grupos al realizar un análisis de varianza, sin embargo el grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con insulina muestran que en la semana dos hubo un aumento en el estado antioxidante, mismo que puede explicarse debido a que en condiciones como la diabetes en los inicios de la enfermedad existe un aumento en las enzimas antioxidantes debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, consecuencia de la hiperglucemia crónica. En cuanto al grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con capitaneja los niveles se mantuvieron más estables, ya que no hubo diferencia significativa cuando se realizó la comparación entre las diferentes semanas. En una investigación realizada en el 2005 se midió el estado antioxidante total en pacientes diabéticos y de no diabéticos y se encontró que los niveles del estado antioxidante total en pacientes diabéticos es menor que en pacientes sanos (Jandric-Balen y cols. 2005).

Con todo lo anterior se puede afirmar que la planta capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) no solamente posee actividad antioxidante *in vitro* sino *in vivo* ya que logró proteger los niveles de las diferentes enzimas de defensa antioxidante, así como una disminución en la lipoperoxidación.

Como objetivo principal de la presente investigación, se midieron las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Como se mencionó en previamente la diabetes mellitus tiene como principal característica bioquímica la hiperglucemia crónica, esta trae como resultado un

aumento en las especies reactivas de oxígeno lo cual conlleva a un aumento en el estrés oxidativo, el cual es un factor que activa al factor nuclear kappa B, responsable de la liberación de moléculas proinflamatorias entre ellas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Rosado-Pérez y Mendoza-Nuñez 2007; Evans JL y cols. 2003; Mohamed AK y cols. 1999; Hattori Y y cols. 2000), esta liberación de moléculas proinflamatorias por un lado provoca resistencia a la insulina ya que tanto el TNF- α como la IL-6 una vez que llegan a sus receptores en la membrana provoca que no se lleve a cabo una correcta translocación de los receptores GLUT 4 a la membrana celular (Ramírez A y Sánchez R, 2012) y por otro lado que la diabetes sea una enfermedad inflamatoria crónica ya que el ciclo se perpetua al no controlar los niveles de glucosa circulante. Esto es preocupante ya que el 46% de las personas que padecen diabetes aún no han sido diagnosticada (FID, 2011).

Dicho lo anterior los resultados obtenidos de las concentraciones de TNF- α se muestran en la gráfica 27 donde se observa que a partir de la semana 2 en el grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con capitaneja las concentraciones de TNF- α se mantuvieron por debajo del grupo de ratas tratadas con insulina, incluso no hubo diferencia significativa entre el grupo de ratas tratadas con capitaneja y el grupo de ratas sanas tratadas con solución salina por lo que el presente estudio aporta que la administración de extracto crudo de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) disminuye las concentraciones de TNF- α .

Existe un gran número de reportes del uso de la fitoterapia en la modulación de citocinas proinflamatorias, algunas de las plantas que poseen estas propiedades son *Bupleurum falcatum*, *Cinnamomum cassia*, *Cnidium monnieri* ya que tras 2 semanas de administración del extracto acuoso de dichas plantas en murinos hubo un descenso en las concentraciones de TNF- α (Spelman K y cols 2006).

Uno de los posibles mecanismos de acción por los cuales la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) logre controlar las complicaciones de la diabetes puede ser a través de este mecanismo, ya que se sabe que el TNF- α es uno de los factores que

contribuyen para la aparición de la resistencia a la insulina, debido a que impide que exista una correcta fosforilación en el receptor de insulina y no se lleve a cabo adecuadamente la translocación del receptor de insulina GLUT-4 a la membrana celular, provocando así una exacerbación del cuadro (Ramírez A y Sánchez R, 2012).

También se ha reportado que los polifenoles del cacao tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y en el año 2010 Jong-Eun y colaboradores reportaron que tras la administración de los polifenoles del cacao se logró disminuir las concentraciones del TNF- α citocina, la cual juega un rol importante en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias (Jong-Eun y cols. 2010).

Hunt S y colaboradores en 2015 probaron el efecto de un extracto comercial de la planta *Artemisia annua* sobre marcadores de inflamación como TNF- α , COX y prostaglandina E2 en neutrófilos activados provenientes de rata, y reportaron que hubo una inhibición provocada por la planta *Artemisia annua* a concentraciones del extracto de 25, 10, and 5 $\mu\text{g/mL}$ de un 89% del TNF- α (Hunt S y cols 2015).

Posteriormente se midieron las concentraciones de IL-1 β (Gráfica 28) en donde no se detectó la presencia de esta citocina en ninguno de los grupos excepto el grupo de ratas sanas con administración de solución salina los cuales fueron niveles muy bajos (menores a los 300pg/ml) lo cual de nueva cuenta se corrobora que el extracto de capitaneja modula la expresión no solo de TNF- α sino de IL-1 β .

Existen reportes de que los polifenoles pueden modular la secreción de moléculas pro inflamatorias, tal es el caso de la investigación que realizó Chen A y colaboradores en el año 2014, en donde descubrieron que los polifenoles presentes en las bluberries suprimieron la expresión del gen de la IL-1 β (Chen A y cols. 2014).

Existen numerosos del uso de la fitoterapia para la modulación de citocinas proinflamatorias tal es el caso del extracto acuoso de la raíz de plantas como *Astragalus membranaceus*, y *Codonopsis pilosula* que tras 24 horas después de la administración logró un descenso en las concentraciones plasmáticas de IL-1 β en humanos (Spelman K y cols 2006)

En una estudio realizado por Edirisinghe y colaboradores donde estudiaron el efecto de las fresas en licuado (10 gramos de fresas congeladas; 94.7 mg de polifenoles totales) sobre marcadores de inflamación en 24 sujetos con sobrepeso tras 6 semanas de administración, en donde observaron que los polifenoles provenientes de las fresas lograron una disminución de la IL-1 β . (Shama V y cols. 2014).

Por último se cuantifico la IL-6 cuyos resultados se presentan en la gráfica 29 se observa que el grupo de ratas tratadas con insulina mantuvo niveles muy elevados de IL-6 durante todo el periodo experimental, en cuanto al grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con capitaneja sus niveles fueron menores y al hacer el análisis de datos no hubo diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de ratas sanas con administración de capitaneja. La IL-6 ha sido estrechamente relacionada como uno de los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina (Zamora-Valdés y cols. 2004; Ramírez A y Sánchez R, 2012; Acosta G 2012). Existen diversos estudios que reportan que el uso de la fitoterapia suprime la secreción de la IL-6 es el caso del estudio realizado por Edirisinghe y colaboradores donde estudiaron el efecto agudo de las fresas en licuado (10 gramos de fresas congeladas; 94.7 mg de polifenoles totales) sobre marcadores de inflamación en 24 sujetos con sobrepeso. A un grupo se les administro placebo y a otros el licuado con las fresas. Las muestras de sangre se recolectaron en el tiempo 0 y 6 horas después de la ingesta y se observó un descenso significativo en las concentraciones de IL-6 (Shama V y cols. 2014).

Estudios epidemiológicos reportan que poblaciones en donde se consumen mayor cantidad de polifenoles tienen una menor incidencia en desarrollar enfermedades inflamatorias crónicas. Los polifenoles tienen la capacidad de modular la activación del factor nuclear kappa B, la biosíntesis de glutatión, eliminación de especies reactivas de oxígeno. Polifenoles como el resveratrol y la curcumina, aumentan la producción de IL-10 la cual es una interleucina antiinflamatoria y suprimen la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Mazor A y Javed N 2008).

Estudios in vivo e in vitro han demostrado que uno de los principales efectos de los polifenoles en los macrófagos es la inhibición de reguladores de la inflamación como la supresión de las cicloxigenasas, óxido nítrico sintasa (iNOS), y citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Cuevas A y cols. 2013).

En la ciudad de Morelia esta planta se usa diariamente comúnmente, por lo que la presente investigación pretende ayudar al tratamiento de la diabetes, siempre y cuando se siga adecuadamente el tratamiento farmacológico.

X. CONCLUSIONES

- La capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee efecto hipoglucemiante
- El extracto crudo, el extracto acetónico y el extracto alcohólico de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) tiene capacidad antioxidante *in vitro*.
- La capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) contiene polifenoles
- La capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) tiene proteínas.
- La capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) posee carbohidratos reductores
- La administración crónica del extracto crudo de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) tiene capacidad antioxidante *in vivo*
- La administración crónica del extracto crudo de capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) inhibe los niveles circulantes de las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α).

XI. PERSPECTIVAS

- 11.1. Probar el efecto hipoglucemiante de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*) en un modelo de ratas con diabetes tipo 2.
- 11.2. Dilucidar el mecanismo de acción de la actividad hipoglucemiante de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*)
- 11.3. Identificar el o los compuestos activos responsables de la actividad hipoglucemiante.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta Garcia E. 2012. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 46 (2): 41-46.
2. Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B y Massela R. 2010. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.* 2010 (11): 1321-1342
3. Arumugam G, Manjula P y Paari N. 2013. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Jour Acut Dis.* (2013): 196-200
4. American Diabetes Association. 2013. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* (38); 1: 8-16.
5. American Diabetes Association. 2015. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.*(36); 1: 67-74
6. Abbas AK, Lichtman HA y Pober JS. 2000. *Inmunología celular y molecular.* 4^o Edición. Editorial: Mc-Graw Hill. Capítulo 11 pp. 243
7. American Diabetes Association. 2013. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *DIABETES CARE.* 36 (1): S67-S74. DOI: 10.2337/dc13-S067
8. American Diabetes Association. 2015. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *DIABETES CARE.* 38 (1):S8–S16. DOI: 10.2337/dc15-S005
9. Andrade Cetto A. 2012. Effects of medicinal plants extracts on gluconeogenesis. *Botanics: Targets and therapy.* 2012 (2): 1-6.
10. Arredondo A., Icaza E. 2011. Costos de la Diabetes en América Latina: Evidencias del Caso Mexicano. *Value in health* (14):S85–S88.
11. Ávalos García A. y Pérez-Urria C. 2009. Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología).* Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
12. Bahadoran Z, Mirmiran P y Azizi F. 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Jour Diab & Metab Dis.* 12 (43): 1-19.

13. Badimon Lina y Martínez-González J. 2006. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006 (6): Pp. 21-30.
14. Balaguer Villegas IM, Cuenca Montero M, Robles M, Pérez Gómez S. 2012. Intervención en educación dietética y ejercicio físico en diabéticos tipo 2. *Med Fam Andal.* 13 (2). 136-151.
15. Balderas Francisco L y Méndez José D. 1998. Influencia de los Radicales Libres Producidos por la Autooxidación de Glucosa y Glucosilación Proteínica en el Desarrollo de Aterosclerosis en Diabetes. *Jour Mex Chem Soc.* 42 (4): 189-195.
16. Balsells M., García-Patterson A, Solà I, Roqué M, Gich I, Corcoy R. 2015. Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 350 (102): Pp. 1-12. doi: 10.1136/bmj.h102
17. Balinsky A, Cristiny Lopes G y Palazzo de Mello JC. 2013. *Molecules.* 2013 (18): 6852-6865
18. Baylei CJ y Day C. 2004. Metformin: its botanical background. *Pract Diab Int.* 21 (3): 115-117.
19. Bhooshan Pandey K y Ibrahim Rizvi S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2 (5): 270-278.
20. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. 1996. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 97 (7): 1715–1722.
21. Brand-Williams W, Cuvelier ME y Berset E. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* (28): 25-30
22. Bradford Marion M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* (72); 248-254.

23. Boletín epidemiológico diabetes mellitus tipo 2 primer trimestre. 2013. En: Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica. Ed. DGE Secretaría de Salud. México: 4. (Disponible: epidemiologia.salud.gob.mx/.
24. Botargues M, Bakalar K, Barani M, Lago VI, Vietto V, Terrasa S. 2011. Riesgos y beneficios de los tratamientos de segunda y tercera línea en diabetes mellitus tipo 2. Evidencia y Actualización en la Práctica Ambulatoria. (2); 138-141.
25. Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi H, Tahri A, Legssyer A. 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity-a review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int J Diabetes Metab* 2006; 14: 1-25
26. Butnariu M y Grozea I. 2012. Antioxidant (antiradical) compounds. *J Bioequiv Availab.* 4 (6): 12-19. doi:10.4172/jbb.10000e18
27. Cárdenas-Rodríguez Noemí y Pedraza-Chaverri José. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química.* 17 (2): 164-173.
28. Castro Juárez C, Villa Ruano N, Ramírez García SA, Mosso González C. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Rev Cub Plant Med.* 19(1):101-120.
29. Chen A., Yan H., Han C., Wang W., Tian Y., Chen X. 2014. Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Internat Jour Biol Macromol.* (69): 382–387.
30. Chow Pak S y Landhäusser Simon M. 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology.* (24): 1129 –1136
31. Clapés Hernández S, Armas Castillo D, Marquetty Hernández A, Lemani Pérez M, Márquez LI, Díaz Arce D y Companioni Gázquez D. 2006. Disminución de la capacidad antioxidante en niños y adolescentes diabéticos. *Rev Cuba Invest Biomed.* 25(2).
32. Coman C, Rugina DO, Socaiu C. 2012. Plants and Natural Compounds with Antidiabetic Action. *Not Bot Horti Agrobi* 40 (1): 314-325.

33. Cornejo-Tenorio G e Ibarra-Manríquez G. 2011. Municipios de Lagunillas y Morelia Michoacán, México: Plantas del Cerro del Águila. Universidad Nacional Autónoma de México. 321 (1): 1-21.
34. Cuevas A., Saavedra N., Salazar LA., Abdalla DS. 2013. Modulation of Immune Function by Polyphenols: Possible Contribution of Epigenetic Factors. *Nutrients*. (5): 2314-2332.
35. Cruz HJ, Licea PME, García HP, Abraham ME, Yanes QM. 2011. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*, 58 (1):4-15
36. Davies MJ, Heller S, Skinner TC, Campbell MJ, Carey ME, Craddock S, Dallosso HM, Daly H, Eaton S, Doherty H, Fox C, Oliver L, Rantell K, Rayman G, Khunti K. 2009. Effectiveness of the diabetes education and self-management for ongoing and newly diagnosed (DESMOND) programme for people with newly diagnosed type 2 diabetes: cluster randomised controlled trial. *BMJ*. Pp. 1-11. doi:10.1136/bmj.39474.922025.BE
37. Danay Heredia R, Douglas Fernández C, Jesús Alfonso R, Elba Rodríguez V, Lucy Santana G y Margarita Rodríguez P. 2014. Sistema antioxidante enzimático e indicadores de daño oxidativo en pacientes diabéticos tipo 2. *Rev. chil. endocrinol. diabetes*; 7 (3): 94-98
38. Delgado-Vargas F., Jiménez AR., Paredes-López O. 2014. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3):173–289.
39. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. 2012 En: Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. 2012. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzarla respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Disponible: ensanut.insp.mx
40. Di Lorenzo C., Dell’Agli M, Colombo E, Sangiovanni E y Restani P. 2013. Metabolic Syndrome and Inflammation: A Critical Review of In Vitro and Clinical Approaches for Benefit Assessment of Plant Food Supplements. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (2013): 1-10.

41. Douglas KA. 1986. Biologically active compounds from plants with reputed medicinal and sweetening properties. *Jour Natu Prod.* 50 (6): 1009-1024
42. Esquivel-Gutiérrez ER, Noriega-Cisneros R, Bello-González MA, Saavedra-Molina A, Salgado-Garciglia R. 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas.* 14 (1): 45-52.
43. Evans JL., Goldfine ID., Maddux BA., Grodsky GM. 2003. Are oxidative stress – Activated Signaling Pathways Mediators of Insuline Resistance and β Cells dysfunction. *Diabetes.* (52): 1-8.
44. Fan Collins Q, Hui-Yu L, Pi J, Liu Z, Quon M y Cao W. 2007. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), A Green Tea Polyphenol, Suppresses Hepatic Gluconeogenesis through 5 AMP-activated Protein Kinase. *Jou Biol Chem.* 282 (41): 30143–30149.
45. Federación Internacional de Diabetes (FID). 2011. PLAN MUNDIAL CONTRA LA DIABETES 2011-2021. 6ta Edicion. Bélgica.
46. Figueroa Hernández JL. 2009. Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Rev Dig Univ.* 10 (9): 1067-6079
47. Foner G, Foner D. Lapeña C, Bermúdez C., Hernández C. 1990. Capítulo 2: Anestesia en el Animal de Laboratorio. *Research In Surgery.* Parte 2. Supl 5: 36-44.
48. Formulario Modelo de la OMS, 2004. Efectos Adversos e Interacciones. Pp. 10. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5422s/s5422s.pdf>
49. Frago Lona JM, Sierra Martínez M, Vargas Alarcón G, Barrios Rodas A, Ramírez Bello J. 2013. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México.* 2013;149:521-30
50. Franz MJ. MS, RD, LD, CDE. 2007. The Dilemma of Weight Loss in Diabetes. *Diabetes Spectrum.* 20 (3): 133-136

51. Galván C. de Teresa, Guisado Barrilao R, García MC, Ochoa J, Ocaña Wilhelmi J. 2008. Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina Rev Andal Med Deporte. 1 (2): pp. 61-72.
52. García Bacallao L, Rojo Domínguez D, Gómez García L. y Hernández Ángel M. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. Rev Cubana Invest Bioméd. 21 (3); 214-216.
53. García-Verdi G, Ramos-Gómez M, Torre-Pacheco I, Guzmán-Maldonado H, Reynoso-Camacho R. 2006. Evaluación del efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico de frijol (*phaseolus vulgaris*) cocido en ratas diabéticas. 2° Congreso Nacional de Química Médica.
54. Gheno Heredia Yaqueline. La etnobotánica y la agrodiversidad como herramientas para la conservación y el manejo de recursos naturales: un caso de estudio en la Organización de Parteras y Médicos Indígenas Tradicionales 'Nahuatlxihuilitl' de Ixhuatlancillo, Veracruz, México (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México
55. González-Torres MC, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. BIOQUIMIA. 25 (1): 3-9.
56. Gómez Pérez Lucina. 2013. Tesis titulada: Respuesta a la alcalinidad del agua de riego con aplicaciones suplementarias de calcio en *Lisianthus*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
57. Gracia Nava MA. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.
58. Guía: ¿Conoces tu riesgo de padecer diabetes de adulto? 2013. Ed. Comunidad de Madrid, Servicio Madrileño de Salud. España: 1-16. Disponible en: <http://www.madrid.org>
59. Guglucci Alejandro. 2000. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. Rev Med Uruguay 2000 (16): 58-75
60. Guerra M, Alvarado M, Librado D y Torres A. 2005. Relación entre la hemoglobina glicosilada, antioxidantes totales y la actividad de las enzimas

- antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa en pacientes diabéticos tipo 2 controlados y no controlados. *Universitas Scientiarum*. (10): 91-97.
61. Halliwell B., Gutteridge JMC. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 18 (1): 125-126.
62. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H y Poutanen K. 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci*. (11): 1365-1402.
63. Hattori Y., Hattori S., Sato N., Kasai K. 2000. High-glucose-induced nuclear factor kB activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* (46): 188–197
64. Hernández-Úrzuza MA y Alvarado-Navarro A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed*. 12(4):272-280.
65. Hunt S, Yoshida M, Davis EJ, Greenhill NS, Davis PF. 2015 An extract of the medicinal plant *Artemisia annua* modulates production of inflammatory markers in activated neutrophils. *Jou Inflamm Res*. (8): 9–14
66. Hee-Ock B, Sung-Jin H, Chun-Sik B, Su-Hyun P, Buk-Gu H, Shela G. 2012. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products* 40 (2): 129–135.
67. Instituto Mexicano para la Competividad A.C. 2012. Kilos de más, pesos de menos: El costo de la obesidad en México. Disponible en: <http://imco.org.mx/>.
68. Jadhav R, Puchchakayala G. 2012. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Int J Pharm Sci*, 4 (2); 251-256
69. Jandric-Balen M, Bozиков V, Bozиков J, Metelko Z, Jandric I, Romić Z. 2005. Impact of glycemic control on antioxidant enzymes activity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Cro*. 33 (4): 132- 135.
70. Jong-Eun K, Eun Son J, Keun Jung S, Joo Kang N, Yong Lee C, Won Lee K y Joo Lee H. 2010. Cocoa polyphenols suppress TNF- α -induced vascular endothelial growth factor expression by inhibiting phosphoinositide 3-kinase

- (PI3K) and mitogenactivated protein kinase kinase-1 (MEK1) activities in mouse epidermal cells. *British Journal of Nutrition* 2010 (104): 957–964
71. Kaneto H, Naoto K, Munehide M, and Takaaki M. 2009. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. (2010): 1-11. doi:10.1155/2010/453892
72. Kedare BS, Singh RP. 2011 Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 48(4):412–422
73. Krishnamurthy P y Wadhvani A. 2012. Antioxidant Enzymes and Human Health. INTECH. Chapter 1. Pp. 3-18. <http://dx.doi.org/10.5772/48109>
74. Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, Shankar V. 2013. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *N Am J Med Sci*. 5 (3): 213-219.
75. Kattah William, Coral Paola, Méndez Fabián. 2007. Evaluación del impacto de un programa de tratamiento y educación en la reducción de los niveles de hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos. *Act Méd Col*. 32 (4): 206-211.
76. La salud, nuevos retos y nuevos padecimientos. 2015. En. *Economía Preventiva: un nuevo horizonte*. Ed. Conferencia Interamericana de Seguridad Social (CISS). México: 70. Disponible en: www.ciss.net
77. Liang-Jun Yan. 2014. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diab Res* (2014): pp. 5
78. Licea Piug ME. 2003. Concentraciones de malondialdehído en un grupo de diabéticos tipo 1 con retinopatía diabética. *AV DIABETOL*. 19: 95-99
79. López V, Akerreta S, Cavero YR y Clavo Isabel. 2007. Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*. 7 (1): 43-47.
80. Lozada AL, Fabian MG, Fernández MR y García MC. 2011. Estudio metabólico de los familiares con diabetes mellitus tipo 2. *Med Int Mex*; 27(1):5-10
81. Luengo López T. 2006. Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante. *OFFARM*. (25) 5: 82-88

82. Maldonado Saavedra O, Jiménez Vázquez EN, Guapillo Vargas MRB, Ceballos Reyes GM, Méndez Bolaina E. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV*. Pp. 33-39
83. Martínez-Cruz NS, Arévalo-Niño K, Verde-Star M, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Núñez-González MA, Morales-Rubio M. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schldl (zarzamora) *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 42 (4): 66-71
84. Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV y Juárez-Oropeza MA. 2011. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *REB* 30 (2): 56-67.
85. Maroyi Alfred. 2013. Traditional use of medicinal plants in south-central Zimbabwe: review and perspectives. *Journ Ethnobi Ethnomed*. 2013 (9) :31.
86. Matés José M, Pérez-Gómez C. y Nuñez de Castro I. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*. 32 (8): 595–603.
87. Mazor AM y Javed NA. 2008. Dietary Polyphenols in Modulation of the Immune System. *Polyphenols and Health: New and Recent Advances*. Chapter 10. Pp: 2
88. Mc Cord Joe M. The evolution of free radicals and oxidative stress. 2000. *Am J Med*. *AmJ Med*. (108): 652– 659.
89. Miranda-Garduño L, Reza-Albarrán A. 2008. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac Méd Méx* 144 (1): 39-46.
90. Meda Paolo. 2012. Protein-Mediated Interactions of Pancreatic Islet Cells. *Scientifica*. 13 (3) 1-22
91. Mirsky Nitsa. 2012. Glucose Tolerance Factor – Insulin Mimetic and Potentiating Agent – A source for Novel Anti Diabetic Medication. *INTECH*. Chapter 10. 165-187.
92. Mohamed AK., Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R., Nawroth P. 1999. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. *BioFactors* (10): 157–167.
93. Mukherjee PK, Nema NK, Bhadra S, Mukherjee D, Braga FC y Matsabisa M. 2014. Immunomodulatory Lead From medicinal plants. *Indian Jour Med Plants*. 13 (2): 235-256.

94. Muoio MD y Newgard BC. 2008. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Mol Cell Biol.* (9): 193-205.
95. Nakae S, Asano M, Horai R y Iwakura Y. 2001. Interleukin 1- β , but not interleukin 1- α , is required for T-cell dependent antibody production. *Immunology.* 104 (3): 402-409.
96. Navajas Luque F y Cano Medina F. 2011. Autoinmunidad Humana. FESITESS ANDALUCÍA. Edición 2011, Málaga, España. Pp. 119.
97. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Diario Oficial.* México. Segunda Sección.
98. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial.* México.
99. Ocegueda SM y Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO. Biodiversitas.* (62): 2-15.
100. Ortiz-García YM, Morales-Velázquez G. 2013. Estrés oxidativo y su papel en la periodontitis. *Revista Tamé* 2 (5); 65-169.
101. Percival Mark. 1996. Antioxidants. *Clin Nutr Ins.* (31): pp 1-4.
102. Pérez-Gutiérrez RM., González-Pérez C., Sánchez-Zavala M., Pérez-Gutiérrez S. 1998. Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud pública Méx.* 40 (4): 354-358.
103. Phoboo S, Da Silva Pinto MD, Lopez Barbosa AC, Sarkar D, Bhowmik P, Kumar Jha P, Shetty K. Phenolic linked biochemical rationale for the anti-diabetic properties of *Swertia chirayita*. *Phytoter Res.* (27): 227-235.
104. Pérez Gastell PL, Pérez de Alejo JL. 2009. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 29(3):192-198.
105. Plazonić A, Bucar F, Maleš Z, Mornar A, Nigović B y Kujundžić N. 2009. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* 2009 (14): 2466-2490
106. PUNCHARD NEVILLE A, WHELAN CLIFF J, ADCOCK IAN. 2004. The journal of inflammation. 1 (1): Pp. 1-4

107. Quiñones M, Miguel M. y Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 27(1): 76-89.
108. Qujeq D, Rezvani T. 2007. Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism* (15) : 22-24
109. Rainer Schultz MD y Gerd Heusch, MD. 2016. Tumor Necrosis Factor and Its Receptors 1 and 2. *Circulation.* 119:1355-1357.
110. Rakesh K, Kalra J, Mantha SV y Prasad K. 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Molec Cell Bioche.* (115): 113-119.
111. Ramírez Alvarado M. y Sánchez Roitz C. 2012. El factor de necrosis tumoral- α , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutr Hosp.* 27 (6); 1751-1757.
112. Ramos Ibarra ML, Batista González CM, Gómez Meda, BC, Zamora Pérez AL. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes Investigación en Salud. 8 (1): pp. 7-15 Centro Universitario de Ciencias de la Salud Guadalajara, México
113. Ramos Rodríguez HG. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciencia veterinaria.* (6): 347-377.
114. Reducing risks and preventing disease: population-wide interventions. En: *Global status report on noncommunicable diseases 2010.* Ed. World Health Organization. Suiza. 2011. Chapter 4: 28, 49.
115. Rodríguez Capote K y Céspedes Miranda E. 1999. Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed.* 18(2):67-76.
116. Renders C, Wagner E, Valk G, Eijk Van J, Griffin S, Assendelft W. 2001. Interventions to improve management of diabetes in primary care, outpatient, and community settings: a systematic review. *Diabetes Care.* (24):1821-1833.
117. Reyes Munguía A, Lorenzo Márquez H, Carranza Álvarez C y Hernández Morales A. 2014. actividad antioxidante de seis plantas medicinales de la región huasteca (Aquismon, S.L.P.). XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica VIII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica XII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. México, Distrito Federal.

118. Robertson Paul R. 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in Diabetes. *Jour Biol Chem.* 41 (8): 42351–42354
119. Rohilla Ankur y Ali Shahjad. 2012. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 3 (2): 819-823.
120. Rodríguez Jiménez L y Del Rio García M. 2013. Actualización y puesta al día en diabetes mellitus tipo 2. Curso de Experto Universitario en Urgencias y Emergencias. Ed. Universidad Internacional de Andalucía. España: 51 pp
121. Rojas Alba M. 2009. Tratado de Medicina Tradicional Mexicana, Bases históricas, teoría y práctica clínico-terapéutica. Tomo I: Historia de la Medicina Tradicional, Pasado y presente de la Medicina Tradicional Mexicana, de la prehistoria a la Medicina contemporánea. Editorial: Tlahui. Tercera Edición. Cuernavaca, Morelos, México.
122. Rosado-Pérez J, Sánchez-Rodríguez M, Galván-Duarte R, Mendoza-Núñez V. 2006. Relación de la resistencia a la insulina con los niveles séricos de leptina, adiponectina, IL- 6 y factor de necrosis tumoral- α en sujetos con diabetes mellitus tipo 2. *Medigraphic.* (31); 115.
123. Rosado-Pérez J y Mendoza-Núñez V. 2007. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 32(2): 58-69
124. Sánchez Rodríguez MA, Santiago Osorio E, Vargas LA, Mendoza Núñez VM. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *BIOQUÍMIA.* 29 (3): 81-90
125. Shama VJ, Indika E Y Burton-Freeman E. 2014. Berries: Anti-inflammatory Effects in Humans. *Jou Agric Food Chem.* (62): 3886–3903.
126. Spelman K, Burns JJ, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. 2006 Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines: A Review of Herbal Immunomodulators. *Alternative Medicine Review Volume.* 11 (2): 128-150
127. Suárez A, Mozo L, Gutiérrez M. Capítulo 9: Citocinas y quimiocinas. *Inmunología-online.* Disponible en: <http://inmunologia-online.tripod.com/tema09/etexto09.htm>

128. Szkudelski T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* (50): 536-546.
129. Taheri E, Mahmoud D, Ahmad S, Ali Malekshahi M, Abolghasem D y Mostafa Q. 2012. The relationship between the activates of antioxidant enzymes in red blood cells and body mass index in Iranian type 2 diabetes and healthy subjects. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders.* 11 (3): 2-5
130. Tomás-Barberán FA. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alim Nutri Salud.* 10 (2): 41-53.
131. Torres M.C., Perales S., Zuñiga C. y Carranza A. 2004. Niveles de malondialdehido y catalasa en tejidos de cobayos nativos de la altura. *Ciencia e Inv.* 7 (1): 28-34
132. Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 en el primer nivel de Atención. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 08/07/2014. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/catalogoMaestroGPC.html>
133. Triana Mantilla ME. 2001. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2 (2):131-41
134. Trujillo Arriaga H.M. 2007. La curva de tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo. *Contacto* (64) 5: 21–24
135. Ullah Asmat, Khan Abad y Khan Ismail. 2015. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 3 (1): 1-7.
136. Valko M, Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* (160): 1–40.
137. Villa-Caballero L, Nava-Ocampo A, Frati-Munari A, Ponce-Monter H. 1999. El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético?. *Gac Méd Méx.* 136 (3): 249-256.
138. Villa Néstor A, Moreno Wilson, Ceballos Alejandro. 2008. Actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en sangre, plasma sanguíneo y plasma seminal en toros Normando. *Rev Col Cienc Pec.* 21 (4): pp. 537-545

139. Villar-Palarsi C y Guinovart J. 1997. The role of glucose-6-phosphate in the control of glycogen synthase. *The FASEB Journal*. (11): 544-558.
140. Weisman NP, Carr MC, Ye J, Cirkel TD, Stewart M, Perry C, Pratley R. 2014. HARMONY 4: randomised clinical trial comparing once-weekly albiglutide and insulin glargine in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin with or without sulfonylurea. *Diabetologia*. 2014 (57): 2475–2484.
141. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimate for year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5):1047-1052.
142. Williams AJ, Choe SY, Noss MJ, Baumgartner CJ y Mustad V. 2007. Extract of *Salacia oblonga* lowers acute glycemia in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2007 (86): 124-130.
143. World Health Organization. Definition, Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Care*. 2011; 34 (Suppl): S62-S69.
144. World Health Organization. 2005. Selected Medicinal Plants. Vol 4. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/areas/traditional/SelectMonoVol4.pdf>
145. Yeh YG., Eisenber DM, Kaptchuk TJ., Phillips RS. 2003. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* 26 (4):1277-1294.
146. Yessoufou A, Gbenou J, Grissa O, Hichami O, Simonin A, Tabka Z. 2013. Anti-hyperglycemic effects of three medicinal plants in diabetic pregnancy: modulation of T cell Proliferation. *Compl Altern Med*.77 (13): 1-13.
147. Yoshida Yasukasu, Umeno Aya y Shichiri Mototada. 2013. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 52 (1): 9–16
148. Zacarías-Eslava LE., Cornejo-Tenorio G., Cortés-Flores J., González-Castañeda Nahú, Ibarra-Manriquez G. 2011. Composición, estructura y diversidad del cerro El Águila, Michoacán, México. *Rev. Mex. Biodiv*. 2011 (82): 854-869.

149. Zamora-Valdes D, Chávez-Tápia NC y Méndez-Sánchez N. 2004. Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina. *Med Sur.* 11 (3): 149-159
150. Zhang H, Park H, Wu J, Chen P, Lee S, Yang J, Dellsperger KC y Zhang C. 2009. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clin Sci.* (116): 219-230.
151. Zhao Y, Yung-Ok S, So-Soon, Yong-Suk J., Jeog-Chae L. 2007. Antioxidant and Anti-hyperglycemic Activity of Polysaccharide Isolated from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Jour Bioch Mol Biol.* 40 (5): 670-677.

XIII. ANEXOS

13.1. Recolección de la capitaneja en el cerro del águila Michoacán, México.



13.2. Identificación científica de la capitaneja (*Verbesina montanoifolia*).



1º de noviembre de 2015.

Dra. Bertha Fenton Navarro
Laboratorio de Glicobiología
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
PRESENTE

Hago de su conocimiento la determinación realizada por el Dr. José Luis Villaseñor de los ejemplares recolectados por Bertha Fenton No. 1 y No.2 en el estado de Michoacán.

Los cuales se ubican en la familia Asteraceae, especie *Verbesina montanoifolia* B. L. Rob. & Greenm. var. *montanoifolia*

Ejemplar No. 1, con folio1423236 en el acervo MEXU.
Ejemplar No. 2, con folio1423237 en el acervo MEXU.

Cabe señalar que estas determinaciones son válidas solamente para los ejemplares referidos, solicitud OD12102015-1.

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente,

M. en C. Verónica Juárez Jiménez
Programa de determinación