



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
DR. IGNACIO CHÁVEZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

“Efecto hipoglucemiante y antioxidante de la administración de *Cuphea procumbens* en un modelo de animales diabéticos”

PARA OBTENER EL GRADO:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA
LICENCIADO EN NUTRICIÓN
FRANCISCO MANUEL OROZCO MONTES

DIRECTORA DE TESIS
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
BERTHA FENTON NAVARRO

MORELIA MICHOACAN, MEXICO

JULIO 2018

El presente trabajo 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 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D en C. Bertha Fenton Navarro.

El trabajo recibió apoyo de CONACyT

Al gran arquitecto del Universo

A mis padres Magali y Francisco

A mis hermanos Daniel y Sara

Agradecimientos

A mi asesora la Dra. Bertha Fenton por su apoyo y soporte en este trabajo de investigación. Por brindarme el conocimiento para mejorar y crecer como profesionista e iniciarme en el camino de la investigación.

A mi comité tutorial Dr. Sergio Gutiérrez, Mtro. Manuel López, Dra. Martha Viveros y al Dr. Christian Cortés por sus aportes útiles y acertados, cuyas observaciones y sugerencias llevaron a la culminación del presente trabajo.

Al gran arquitecto del Universo por permitirme llegar hasta este punto y lograr mis objetivos.

A mis padres Magali y Francisco por el apoyo y consejos que siempre me han brindado, por ser la columna de hierro en mi vida. Por ser ejemplos de vida y éxito, estoy orgulloso de seguir sus pasos.

A mis hermanos Daniel y Sara por estar a mi lado en todo momento, quienes con su muestra de cariño me motivan a seguir adelante.

A mis amigos y compañeros por brindarme su amistad desde el inicio de la maestría y su excepcional apoyo en todo momento.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	_____	i
ÍNDICE DE TABLAS	_____	ii
ÍNDICE DE GRAFICAS	_____	iii
ABREVIATURAS	_____	iv
RESUMEN	_____	v
ABSTRACT	_____	vi
I. INTRODUCCIÓN	_____	1
II. JUSTIFICACIÓN	_____	28
III. HIPÓTESIS	_____	29
IV. OBJETIVOS	_____	29
V. MATERIAL Y MÉTODOS	_____	30
VI. ANALISIS ESTADISTICO	_____	36
VII. RESULTADOS	_____	37
VIII. DISCUSIÓN	_____	60
IX. CONCLUSIONES	_____	66
X. PERSPECTIVAS	_____	67
XI. REFERENCIAS	_____	68
XII. ANEXOS	_____	82

ÍNDICE DE FIGURAS

	Figura	Página
Figura 1.	Representación esquemática de la biosíntesis de metabolitos secundarios	18
Figura 2.	Rutas de absorción y metabolismo de polifenoles dietéticos y sus derivados	22
Figura 3.	Mecanismos potenciales de los polifenoles en la homeostasis de la glucosa	25
Figura 4.	Ubicación geográfica del municipio de Charo	30

INDICE DE TABLAS

	Cuadro	Página
Tabla 1.	Clasificación de Hemoglobina glicosilada.	5
Tabla 2.	Fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes.	13
Tabla 3.	Distribución grupos administración aguda	35
Tabla 4.	Distribución grupos administración crónica.	35
Tabla 5.	Concentración de polifenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de <i>Cuphea procumbens</i>	38
Tabla 6.	Concentración de flavonoides en extractos acuoso, acetónico y alcohólico de la hierba de la calavera	39
Tabla 7.	Concentración de fenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de la hierba de la calavera	41
Tabla 8.	Control ácido ascórbico y gálico, para la cinética enzimática	42
Tabla 9.	Resultados cinética enzimática de los extractos; acuoso, acetónico y alcohólico	42
Tabla 10.	Clasificación de la eficiencia antiradical	43
Tabla 11.	Porcentaje del efecto hipoglucemiante en los diferentes extractos de <i>Cuphea procumbens</i> en DM1	51
Tabla 12.	Porcentaje del efecto hipoglucemiante en los diferentes extractos de <i>Cuphea procumbens</i> en DM2	55
Tabla 13.	Peso de los animales durante la administración crónica.	56
Tabla 14.	Glucemia de los animales durante la administración crónica	58
Tabla 15.	Prueba de orina en ratas con DM2 en administración crónica	59

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.	Curva de calibración de Florogluciol.	37
Gráfica 2.	Curva de Calibración de Quercertina	39
Gráfica 3.	Curva de calibración del ácido gálico	40
Gráfica 4.	Comportamiento cinético de los extractos de flor y hoja	42
Gráfica 5.	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acuoso de la hoja de Cuphea procumbens en machos con DM 1.	44
Gráfica 6.	Curva de Glucosa en Ayuno con extracto acuoso de la hoja de Cuphea procumbens en machos con DM 1	45
Gráfica 7.	Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas macho con DM1 contrastando el efecto del extracto acuoso de la hoja fresca y seca	46
Gráfica 8.	Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas macho con DM 1 mostrando el efecto del extracto acetónico	47
Gráfica 9.	Curva de Glucosa en ayuno en ratas macho con DM 1 mostrando el efecto del extracto acetónico.	48
Gráfica 10.	Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas macho con DM 1 mostrando el efecto del extracto alcohólico.	49
Gráfica 11.	Curva de Glucosa en ayuno en ratas macho con DM 1 mostrando el efecto del extracto alcohólico	50
Gráfica 12.	Curva de Tolerancia a la Glucosa con diferentes dosis del extracto acuoso de la hoja en el modelo de DM2	52
Gráfica 13.	Porcentaje de Variación de glucosa en ratas macho con DM2.	53
Gráfica 14.	Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas con DM 2 contrastando el efecto del extracto acuoso de la hoja fresca y seca.	54
Gráfica 15.	Curva de Glucosa en Ayuno con extracto acuoso de la hoja de Cuphea procumbens en machos con DM 2	55
Gráfica 16.	Peso de los animales durante la administración crónica.	57
Gráfica 17.	Glucemia de los animales en el periodo de administración crónica	58
Gráfica 18.	Hemoglobina glicosilada en el período de administración crónica.	59

ABREVIATURAS

ACO-1	Acil CoA oxidasa-1	IL	Interleucina
ADA	American Diabetes Association	IMCO	Instituto Mexicano para la Competitividad
ADN	Ácido desoxirribonucleico	IPP	Isopentilfosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato	IRS2	Sustrato receptor de insulina 2
CDC	Centro de Control de Enfermedades	Kg	kilogramo
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades	MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad	MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
COX2	ciclooxigenasa-2	MDA	Malondialdehído
CPT-1 β	Carnitina palmitoil transferasa-1β	mg	Miligramo
CRP	Proteína C-reactiva	mM	Milimolar
DM	Diabetes mellitus	NaCl	Cloruro de Sodio
DMAPP	dimetilalil pirofosfato	NF-κB	Factor nuclear kappa B
DOX5P	desoxifilulosa 5-fosfato	NOM	Norma Oficial Mexicana 015-Ssa2-2010
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil	O₂⁻	Anión Súper Óxido
E4-P	Eritrosa-4-fosfato	¹O₂	Oxígeno singulete
EGCG	Epigalato de catequina	OECD o OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud	OMS	Organización Mundial de la Salud
FGE	Floroglucinol	OS	Estrés oxidativo
FID	Federación Internacional de Diabetes	PEP	Fosfoenolpiruvato
FOXO1	Proteína O1 de caja de forkhead	PEP	gliceraldehído 3-fosfato
FPP	Farnesil pirofosfato	PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
G6Pase	glucosa-6-fosfatasa	PP	Pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato	PYR	piruvato
GK	Glucoquinasa	QE	Equivalentes de
GLP1	Péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)	ROO•	Radical peroxilo
GLUT	Transportador de glucosa	ROOH o LOOH	Lipoperóxido
GPP	Geranil pirofosfato	SGLT-1	Transportador de glucosa dependiente de sodio
GPx	Glutación peroxidasa	SOD	Superóxido dismutasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	SREBP-1	Proteína de unión al elemento regulador del esteroide
HbA1c	Hemoglobina glicosilada	TBA	Tiobarbitúrico
HO•	Radical hidróxido	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

Introducción: La diabetes es una epidemia cuyo número de personas que la padecen, va en acenso exponencial. En el informe de la Federación Internacional de Diabetes se dio a conocer que México es el sexto país con mayor cantidad de adultos con diabetes. Es una enfermedad que produce un estrés oxidativo a nivel sistémico. Esto favorece la aparición de complicaciones y representa un obstáculo al instaurar tratamientos. El tratamiento actual de la diabetes abarca el uso de insulina o agentes hipoglucemiantes, de acuerdo al tipo de diabetes; sin embargo, estos solo actúan a nivel de la glucemia, pero no presentan ningún efecto sobre el estrés oxidativo. La actual situación hace necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas. Se ha descrito que diferentes compuestos presentes en las plantas como los polifenoles y flavonoides pueden intervenir de manera positiva al controlar el estrés oxidativo, disminuyendo las especies reactivas de oxígeno, siendo una buena alternativa para complementar las directrices de tratamiento. **Objetivo general:** Evaluar el efecto hipoglucemiante y antioxidante de la administración oral de *Cuphea procumbens* en un modelo de animales diabéticos. **Material y Métodos:** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar a partir de 250g, los animales 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*. **Resultados:** La evaluación *in vitro* de la planta mostro presencia de compuestos secundarios como polifenoles, fenoles y flavonoides; el extracto acuoso de hoja mostro la mayor cantidad de polifenoles (126.07 ± 44.14 mg de floroglucinol/g de extracto) y flavonoides (125.86 ± 0.05 mgQE/g tejido). Se cuantifico la actividad antioxidante realizando la medición de la eficiencia antiradical de los extractos siendo el extracto alcohólico de la flor el que presento mayor concentración (1897×10^{-3}). Se evaluó la actividad hipoglucemiante de la hoja en los extractos acuoso, acetónico y alcohólico con curva de tolerancia a la glucosa oral (CTG), en dos modelos de diabetes mellitus; en el modelo de DM1 el mayor porcentaje de reducción se obtuvo con la dosis de 150 mg/kg (28%), siendo esta la dosis óptima, en el extracto acetónico la reducción en una dosis de 0.4 g/kg fue del 18%. Posteriormente se probó la dosis óptima en curvas de ayuno (CGA) (150 mg/kg) mostrando una disminución del 33%. En el modelo de DM2 al probar las diferentes dosis en CTG, se observó que el extracto acuoso presenta la mayor reducción en la dosis de 50 mg/kg (26%), la misma dosis se probó CGA mostrando una reducción de 12%, en ambas pruebas a los 120 min la glucemia alcanzaba los valores iniciales. Por último se evaluó su efecto hipoglucemiante de forma crónica durante 12 semanas en las cuales se observó un aumento de peso, una normalización de la glucemia en la semana 2 la cual se mantuvo hasta finalizar la administración, los animales comenzaron con una HbA1c del 14% y normalizaron valores alrededor del 6%, por último en las pruebas de orina se observo la disminución en la presencia de glucosa, cuerpos cetónicos y proteínas reflejandose dentro del estado de salud del organismo así como mostrando un control del estrés oxidativo. **Conclusión:** El presente trabajo muestra la actividad antioxidante *in vitro* y el efecto hipoglucemiante que posee la planta *Cuphea procumbens*, la cual no mostró toxicidad en la administración crónica, todo lo anterior sugiere que la planta puede controlar la hiperglucemia y disminuir los daños causados por el estrés oxidativo debido a los antioxidantes que presenta. **Palabras Claves:** Hipoglucemiante, antioxidante, diabetes 1, diabetes 2 y plantas medicinales.

Abstract

Introduction: Generally speaking diabetes is an epidemic whose number of people increase exponentially. In the report of the International Diabetes Federation it is known that Mexico is the sixth country with the highest number of adults with diabetes. In fact diabetes can produce an oxidative stress at a systemic level. Due to the appearance of complications this represents an obstacle when establishing treatments. The current treatment of diabetes involves the use of insulin or hypoglycaemic agents, according to the type of diabetes, however these only act at the level of glycemia, but has no effect on oxidative stress. The current situation makes it necessary to seek new therapeutic alternatives. It has been disseminated that the different compounds present in plants such as polyphenols and flavonoids can be involved in the reduction of the oxidative stress, decreasing reactive oxygen species, being a good alternative to complement treatment guidelines. **Objective:** To evaluate the hypoglycemic and antioxidant effect of the oral administration of *Cuphea procumbens* in a model of diabetic animals. **Material:** It was used rat male of the Wistar strain of 250g, the animals were kept in acrylic cages under the controlled conditions of light-darkness (12h/12h) and temperature ($25\pm 2^\circ\text{C}$), with food supply and water *ad libitum*. **Results:** The *in vitro* evaluation of the *Cuphea procumbens* plant showed the presence of secondary compounds such as polyphenols, phenols and flavonoids; the aqueous leaf extract showed the highest amount of polyphenols (126.07 ± 44.14 mg of floroglucinol / g extract) and flavonoids (125.86 ± 0.05 mgQE/g tissue). The aqueous extract of the flower contains a greater presence of phenols (715.29 ± 33.4 mgGAE/g tissue). The antioxidant activity was quantified by measuring the antiradical efficiency of the extracts, with the alcoholic extract of the flower having the highest concentration (1897×10^{-3}). The hypoglycemic activity of the leaf in the aqueous, acetic and alcoholic extracts was measured with oral glucose tolerance curve (CTG) was evaluated in two models of diabetes mellitus; in the DM1 model, the highest percentage of reduction was obtained with the dose of 150 mg/kg (28%), this being the optimum dose, in the acetone extract the reduction in a dose of 0.4 g/kg was 18%. Subsequently, the optimal dose was tested in fasting curves (150 mg/kg) showing a 33% decrease. In the DM2 model when testing the different doses in CTG, it was taken into account that the aqueous extract had the greatest reduction in the dose of 50 mg/kg (26%), the same dose was tested in the fasting glucose curve showing a reduction of 12%, in both tests at 120 minutes the glycemia reached the initial values. Finally, its hypoglycaemic effect was evaluated chronically for 12 weeks in which an increase in weight was observed, a normalization of glycemia in week 2 which was maintained until the end of administration, the animals started with a HbA1c of 14% and normalized values around 6%, finally in urine tests the decrease in the presence of glucose, ketones and proteins reflected in the state of health of the organism as well as showing a control of oxidative stress was observed. **Conclusion:** The present work shows the antioxidant activity *in vitro* and the hypoglycaemic effect of the plant *Cuphea procumbens*, which showed no toxicity in the chronic administration, all the above suggests that the plant can control the hyperglycemia and diminish the damages caused by the oxidative stress due to the antioxidants it presents in the plant *Cuphea procumbens*.

I. Introducción

Desde el siglo XIX la tasa de prevalencia de diabetes ha aumentado de forma exponencial, ubicándola actualmente como una de las epidemias del siglo XXI y un reto de salud global, el objetivo primordial es reducir el alto costo económico que representa para la sociedad y los sistemas de salud así como también mejorar la calidad de vida de quienes padecen diabetes y sus familiares (Hernández-Ávila *et al.* 2013). Los datos epidemiológicos muestran que la enfermedad a nivel mundial progresa pasando de ser en el 2014 un total de 387 millones de personas con diabetes ser 427 millones de personas con diabetes en el 2017. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, México es el quinto lugar de los primeros 10 países con mayor número de adultos con diabetes. La ENSANUT 2012 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) indicó que en nuestro país había 6.4 millones de adultos que padecían diabetes de un total de 11.9 millones de habitantes, 12.5 millones son adultos padecen diabetes (FID, 2015).

México tiene la más alta prevalencia de obesidad y diabetes en el mundo, entre las personas que padecen esta enfermedad, no tienen un buen control glicémico y su tratamiento no toma en cuenta los demás factores de riesgo (hipertensión y dislipidemias) (Alegre-Díaz *et al.* 2016).

Las entidades del país con mayor prevalencia de esta enfermedad son la ciudad de México, Nuevo León, Estado de México, Veracruz y Tamaulipas (Hernández-Ávila *et al.* 2013).

La diabetes es una enfermedad que conlleva altos costos al sector salud el cual asciende los 85 millones de pesos anuales según el Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO). En el 2005 se estimó el costo de la diabetes para el país el cual sería de \$140 millones de dólares, para el cálculo tomaron en cuenta aspectos como la atención médica, tratamiento farmacológico, hospitalización y el tratamiento de las complicaciones (Rull *et al.* 2005). En el 2006 el costo de la diabetes al país fue de \$1,200 millones de dólares, y en el 2010 la estimación era de aproximadamente \$3,400 millones de dólares, mostrando un incremento del 8% por un periodo de 5 años (Barquera *et al.* 2013).

La sabiduría ancestral de puede aportar conocimiento, para la resolución de la problemática actual con la diabetes. Es por ello que la medicina tradicional mediante el uso de plantas medicinales está aumentando su relevancia. Se sabe que los componentes de las plantas presentan capacidad antioxidante, anticancerígena, hipoglucemiante, antiinflamatoria, entre otras. Las culturas prehispánicas mediante un conocimiento empírico emplearon las plantas para el tratamiento de diferentes enfermedades, siendo este conocimiento la base de toda investigación (Castro Juárez *et al.* 2014).

1.1 Definición de Diabetes

Existen varias definiciones de la diabetes como la que propone la Organización Mundial de la Salud (OMS) donde se define a la diabetes como una enfermedad crónica presentada debido a que el páncreas no produce insulina o el organismo no la utiliza de forma adecuada. Esta definición es parecida a la de la CDC donde refieren a la diabetes como una enfermedad en la cual los niveles de glucemia están por encima de lo normal, dado que el páncreas que es el órgano secretor y productor de la hormona insulina se ve afectado y el cuerpo no produce suficiente insulina o no puede utilizar su propia insulina adecuadamente (CDC, 2016).

Por otra parte el Dr. Alberto Lifshitz de la facultad de medicina de la UNAM da el siguiente concepto de diabetes: “la diabetes es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una insuficiente acción de la insulina endógena, lo que suele provocar hiperglucemia, alteraciones en los lípidos séricos y lesiones vasculares” (Lifshitz, 2008).

Ambas definiciones en su descripción hablan de forma general de la diabetes, sin embargo ninguna habla de los sucesos a nivel celular, donde el estrés oxidativo es un factor importante que puede llevar a la resistencia de la insulina, así como ser una causa importante de las complicaciones, micro y macrovasculares de la diabetes.

1.2 Tipos de Diabetes

La OMS, la ADA, 2010 y la NOM aplican criterios de clasificación muy parecidos, como lo propone la CIE-10 de la siguiente forma:

Diabetes de tipo 1; se ha subclasificado en dos tipos, la primera es llamada “Diabetes inmunomediada” como el nombre lo describe el sistema inmunológico se ve comprometido provocando la destrucción de las células beta productoras de insulina, generando en el organismo un déficit de insulina (ADA, 2010). Las enfermedades autoinmunes a las que se asocia son la enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad gástrica autoinmune. El segundo subtipo es llamado diabetes idiopática ya que en ella no se ha encontrado que este comprometido el sistema inmune (Hayes, 2008). La prevalencia de este tipo según la federación internacional de diabetes es de aproximadamente 22 de cada 100,000 personas mayores de 14 años (Valentine *et al.* 2018).

Diabetes de tipo 2; la fisiopatología de este tipo de diabetes indica un desarrollo de forma crónica y se definió como un síndrome heterogéneo iniciado por interacciones genético-ambiental (Reyes Sanam *et al.* 2016), en la cual a nivel clínico se caracteriza por una hiperglucemia crónica. Se ha descrito el “octeto del mal agüero”, que llevan a un estado de hiperglucemia. El octeto comprende la disminución del efecto de incretinas, aumento de la lipólisis, aumento de la reabsorción tubular de glucosa en el riñón, disminución de la captación de glucosa por el músculo, mal funcionamiento de los neurotransmisores, aumento a nivel hepático de la gluconeogénesis, aumento de la secreción de glucagón en las células alfa pancreáticas y disminución paulatina de la secreción de insulina por el páncreas (Cipriani-Thorne y Quintanilla, 2010). La ADA y la Asociación europea para el estudio de la diabetes recomiendan como primera línea de tratamiento el uso de metformina junto con dieta y ejercicio (Orsini-Federici *et al.* 2018).

Diabetes gestacional; se define como la intolerancia de carbohidratos de intensidad variable, la cual no fue diagnosticada antes de la gestación, y que se presenta durante

alguno de los tres trimestres del embarazo (Pérez *et al.* 2012). Es importante tener en cuenta que este tipo de diabetes no es causada por carencia de insulina o defectos en su producción, la diabetes gestacional es el resultado del incremento de hormonas que generan efectos bloqueadores sobre la producción de insulina, a esto se le denomina resistencia a la insulina, y su aparición es en la vigésima semana de gestación (Ríos-Martínez *et al.* 2014). El diagnóstico se confirma con una glucemia en ayuno mayor de 126 mg/dL, una glucemia postprandial mayor a 200 mg/dL y una hemoglobina glicosilada <6.5% (Pérez *et al.* 2012).

Otros tipos específicos de la diabetes, como pueden ser defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, inducidas farmacológicamente o químicamente y endocrinopatías (Iglesias-González *et al.* 2014; ADA, 2010)

1.3. Formación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c)

La unión covalente no enzimática de la glucosa con la hemoglobina comienza con una reacción de Amadori mediante intermedios de aldimina que forman bases de Schiff dando como resultado diversas hemoglobinas glucosiladas, donde HbA1c es una cetoamina derivada de la glicosilación irreversible de la N-terminal de valina (Shing-Leow, 2016).

Cuando se combina la glucosa con la hemoglobina a través de procesos de glicación forma la HbA1c pero cuando se une a la albumina forma la fructosamina la cual se forma de igual manera por reacciones no enzimáticas con la glucosa, las pruebas de fructosamina provén un índice a corto plazo del control glucémico (7 a 10 días), mientras que la HbA1c refleja la concentración previa de 4 a 8 semanas (Rajamani *et al.* 2005)

1.4. Criterios de clasificación de hemoglobina glicosilada

La medición de la hemoglobina glicosilada es el criterio más utilizado para evaluar el control metabólico, el objetivo de su identificación es disminuir o retrasar la aparición de complicaciones de la diabetes (Lenz *et al.* 2014). Un comité de expertos integrados por miembros de la ADA, Asociación europea para el estudio de la diabetes y la IDF (International Diabetes Federation), se recomendó la inclusión de la HbA1c para usarse como diagnóstico inicial de diabetes tipo 2, al confirmar una HbA1c $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol), sin pruebas de glucosa (Múnera-Jaramillo *et al.* 2011). El siguiente cuadro muestra las equivalencias entre los valores de hemoglobina glicosilada y la glucemia en ayunas (Pereira *et al.* 2015), que permiten interpretar como ha estado el nivel de glucemia durante los últimos 3 meses a partir de la hemoglobina A1c.

TABLA 1. Clasificación de Hemoglobina glicosilada.

Hemoglobina glicosilada (%)	Glucemia en ayunas (mg/dL)
<6,5	60 a 110
6,5 a <7	111 a 126
7 a 7,9	127 a 180
8 a 9,5	181 a 200
>9,5	>200

(Pereira *et al.* 2015)

En la población mexicana estudiada por Alegre-Díaz *et al.* 2016, un 36% de los participantes tenían una hemoglobina glicosilada mayor al 10%, lo que se traduce como un mal control metabólico que provoca el desarrollo de complicaciones, las cuales aumentan la probabilidad de muerte de los pacientes. Por lo que debería prestarse más interés a la hemoglobina glicosilada como un marcador del control metabólico y no como una herramienta de diagnóstico.

1.4 Problema de salud en México

El nivel de desarrollo de la diabetes en el país es crítico y avanza de forma alarmante ya que en tan solo 3 años el aumento del número de adultos con diabetes fue de aproximadamente 5 millones, tal como lo muestran datos de la ENSANUT 2012 los cuales muestran a México con un número de personas que padecen diabetes de 6.4 millones de adultos mexicanos aumentando a 12.5 millones en el 2017 según datos de la Federación Internacional de Diabetes, colocando a la diabetes como una de las principales causas de muerte en el país. En 1980 se registraron en México 14 mil muertes por la diabetes, en el 2014, 94 mil muertes por diabetes y en el 2016 se tienen estimadas 98,450 fallecimientos debido a la diabetes. Esto provoca un aumento en la inversión de presupuesto para la prevención y el tratamiento de la diabetes mellitus. Tan solo en México el costo de diabetes asociada a sobrepeso u obesidad es de 85 millones de pesos anuales según el Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO). La Encuesta Nacional De Salud y Nutrición estimó el costo anual de la diabetes por persona de aproximadamente 707 dólares anuales (ENSANUT, 2012), siendo un costo total al año de 3,872 millones de dólares. Sumado a los factores previamente mencionados, la falta de acceso a servicios de salud que sufre la población mexicana del medio rural, ya sea porque hay limitaciones geográficas, presencia de la marginación social o falta de recursos económicos (Jorand, 2008), hace visible la necesidad de buscar fuentes alternativas de terapia para controlar este problema de salud. Por lo que la medicina tradicional puede tener puntos clave que complementen los tratamientos actuales. Se ha documentado que las plantas pueden ser una alternativa eficaz, especialmente durante las primeras etapas de la enfermedad (Castro-Juárez *et al.* 2014).

1.5 Daño oxidativo

El daño oxidativo generado a nivel celular se da por la participación de varios componentes como son los radicales libres y los antioxidantes. Se define a los radicales libres o también

llamados especies reactivas de oxígeno (ROS), como moléculas cuya estructura presentan un átomo o electrón desapareado o impar, conllevando a la inestabilidad de la molécula (Lobo *et al.* 2010). Dentro de este grupo de especies reactivas al oxígeno se han identifican al Anión Súper Óxido (O_2^-); Peróxido de hidrógeno (H_2O_2); radical hidróxido (HO^\cdot) y a oxígeno singulete (1O_2) (Mayor Oxilia, 2010; Seifried *et al.* 2007). El término antioxidante se refiere a cualquier molécula con la capacidad de estabilizar o desactivar a los radicales libres antes de que generen daño celular (Rahman, 2007). Se entiende por daño oxidativo o estrés oxidativo al aumento de las especies reactivas de oxígeno y una disminución de la cantidad de antioxidantes lo anterior genera una amplia cantidad de alteraciones genéticas, metabólicas y de respuesta celular (Urquiza-Martínez 2016). El aumento de los radicales libres se puede generar de forma endógena o exógena, o mediante una reducción de las defensas antioxidantes (Seifried *et al.* 2007). Las enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus (DM), presenta un mayor número de posibilidades para generar elementos oxidativos durante la génesis, evolución o complicaciones por su capacidad de generar estados oxidantes y de afecciona la eficiencia de recuperación de los mecanismos antioxidantes (Mayor-Oxilia, 2010). Algunos otros mecanismos descritos es que favorecen aumentos de radicales y disminución de antioxidantes en la diabetes se deben a la presencia prolongada de hiperglucemia, este estado incrementa la vía de poliol, la formación intracelular de productos de glicación avanzada, la activación de la proteína cinasa C y el aumento del flujo de la vía de hexoamina (Giacco *et al.* 2010). Todos los factores mencionados generan la pérdida del balance en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante, en la DM esto puede explicar el daño oxidativo que presentan las macro-moléculas, dando lugar a alteraciones oxidativas en el DNA, las proteínas y los lípidos (Avello y Suwalsky, 2006; Matough *et al.* 2012).

De igual forma, defectos en la defensa antioxidante se han asociado con un incremento en el riesgo de las complicaciones (Calderón-Salinas *et al.* 2013). Por lo anterior se ha propuesto la evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes para conocer el papel que desempeñan en la DM.

1.6 Mecanismos de protección contra el estrés oxidativo de los organismos

Los efectos antioxidantes en el estrés oxidativo observado en la diabetes se realiza mediante marcadores enzimáticos como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa y peroxidasa (Matough *et al.* 2012). Entiéndase por antioxidantes aquella sustancia que reaccionan como sistema de defensa contra especies reactivas de oxígeno o radicales libres previniendo los efectos negativos sobre funciones fisiológicas normales del organismo (Coronado *et al.* 2015). Dentro de los principales mecanismos antioxidantes en el organismo encontramos tres líneas de defensa antioxidante; la primera consiste en eliminadores de radicales libres (scavengers), enzimas con capacidad para reparar el daño causado por el estrés oxidativo en estructuras de macromoléculas se incluyen en la primera línea antioxidante a la vitamina C, el α -tocoferol, carotenoides y flavonoides, el antioxidante de mayor importancia es el glutatión, así como la glutatión reductasa. Esta última su forma de acción es en estado oxidado y su importancia radica en que recupera el estado previo del ácido ascórbico y del alfa tocoferol después de que participaron en la eliminación de especie reactivas de oxígeno (Nowotny, 2015).

La segunda línea de defensa contiene antioxidantes enzimáticos que pueden convertir a los radicales libres en especies menos reactivas, dentro de esta línea de defensa se encuentran las superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), estas enzimas pueden neutralizan el daño oxidativo de especies reactivas como el superóxido o el peróxido de hidrogeno, favoreciendo una menor concentración de radicales libres con la consecuente disminución del estrés oxidativo. Dentro de esta línea de defensa también se encuentra la catalasa la cual es una enzima tetramérica que contiene un grupo prostético de protoporfirina 9 y protohémico, su actividad es elevada a nivel del hígado y riñones, a nivel celular la encontramos en las mitocondrias y en los peroxisomas, pero en el eritrocito lo encontramos en el citosol. Su función enzimática se caracteriza por catalizar el peróxido de hidrogeno, para reducirlo a una molécula de agua y otra de oxígeno (Nowotny, 2015; Lobo *et al.* 2010).

En la última línea de defensa se encuentran enzimas como la catepsina y el sistema lisosomal que tienen la capacidad de reparar o restaurar aminoácidos que se modificaron por la oxidación, como la metionina y la cisteína, cuando falla esta reparación varias proteasas reconocen y remueven a las proteínas disfuncionales como una forma de prevenir la acumulación intracelular de estas moléculas y el daño a la célula (Nowotny, 2015). Además se ha observado que en esta línea puede existir la reparación *de novo* de antioxidantes (Lobo *et al.* 2010).

En forma general se puede decir que el sistema de defensa antioxidante funciona cuando ocurre una colisión entre la especie reactiva de oxígeno y el antioxidante, donde este último cede un electrón convirtiéndose en una especie reactiva de oxígeno débil que no es tóxico para el organismo, aquí actúan los antioxidantes enzimáticos que catalizan las reacciones en donde son usadas sustratos utilizando las especies reactivas de oxígeno (Mayor-Oxilia, 2010).

1.7 Estrés oxidativo en la diabetes

La diabetes mellitus conduce al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a una reducción de las defensas antioxidantes, incrementándose el estrés oxidativo (OS) responsable de muchas de las complicaciones (Montier-Iglesias *et al.* 2015).

El estrés oxidativo constituye una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Betteridge, 2000). Es el producto del desequilibrio de la relación, cantidad de ROS frente a la capacidad del organismo de eliminarlos. En los diabéticos hay mayor producción de ROS y debilitamiento de las defensas antioxidantes responsables de la eliminación de los radicales libres (Avello y Suwalsky, 2006).

En la hiperglucemia crónica producida por la diabetes, los radicales de oxígeno se encuentran aumentados, las defensas antioxidantes están disminuidas lo anterior provoca una mayor presencia de reacciones oxidativas, sobre todo la peroxidación lipídica y el ataque de los radicales hidroxilo al ácido desoxirribonucleico (ADN) alterando estructuralmente a las proteínas, como se mencionaba anteriormente los efectos son

derivados de un aumento en la vía de poliol, formación intracelular de productos de glicación avanzada, activación de la proteína cinasa C y el aumento del flujo de la vía de hexoamina (Giacco *et al.* 2010). La hiperglucemia destruye gradualmente las defensas antioxidantes, haciendo posible que otras moléculas se vean comprometidas, incluso las estructurales (proteínas, lípidos), debido a que esta condición incrementa la entrada de substratos metabólicos a la mitocondria sobrecargando el sistema de transporte de electrones lo que lleva a una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (Yu *et al.* 2006). Además tanto la glucosa como sus productos de glicación son potentes reductores que generan radicales de oxígeno (Montier-Iglesias *et al.* 2015).

Los reportes del daño causado a la diabetes mellitus tipo 1 y a la diabetes mellitus 2 por el estrés oxidativo son muy parecidos, el estrés genera un aumento de problemas a nivel cardiovascular como la enfermedad isquémica, favorecer la resistencia a la insulina, apoptosis y disfunción de la célula beta pancreática (Nowotny, 2015). En las proteínas el daño oxidativo puede causar carbonilación, oxidación o entrelazamiento, estas modificaciones incrementan la susceptibilidad de la macromolécula a la proteólisis. La proteína que se ve afectada es la insulina, en la cual los cambios estructurales y químicos provocan la pérdida de su actividad biológica. El estrés carbonílico afecta directamente a los receptores de insulina y a moléculas que favorecen la liberación de insulina, aumentando la resistencia periférica a la insulina (Calderón-Salinas *et al.* 2013). Además del daño ocasionado a proteínas el estrés oxidativo puede alterar lípidos membranales y ácidos nucleicos (Rahman, 2007), generando rutas de señales intracelulares como la de la proteína quinasas activadas por mitógenos (Vía MAPK), con las cuales se favorece la producción de citocinas proinflamatorias, generando un círculo de inflamación a nivel celular que lleva a la atrofia o disfuncionalidad de la célula (Oyagbemi *et al.* 2014).

La glucosa es la molécula que da energía a nuestro metabolismo, siendo la principal molécula en oxidarse. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son producto de la reducción de oxígeno, debido a que el catabolismo es un proceso oxidativo, causando la pérdida de electrones de una molécula que será oxidada. En el caso de la glucólisis, la

glucosa es convertida en piruvato produciendo acetil-CoA, generando cofactores que serán reducidos en el ciclo de Krebs, siguiendo a la cadena respiratoria, lo anterior genera como producto indeseable al superóxido $O_2^{\cdot-}$. Un aumento de la glucosa produce glioxal y 3-desoxiglucosa (oxoaldehídos), que afectan los radicales α -hidroxialdehído y generan daño oxidativo. Por otro lado la acumulación de los intermediarios de la glucólisis como lo es el dihidroxiacetona-P y el gliceraldehído-3-P (Calderón-Salinas *et al.* 2013).

Durante el estrés oxidativo los radicales libres generados en la diabetes mellitus actúan a nivel celular dañando las proteínas, lípidos y el ADN de la célula, los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden ser cambios en la conformación estructural, pérdida de funciones, iniciar la respuesta inflamatoria, causar envejecimiento o muerte dependiendo de la biomolécula que están afectando. En el caso de los lípidos el efecto de los ROS sobre estos es a nivel de su estructura, donde el radical libre llega a interactuar con los carbonos cercanos en los dobles enlaces del ácido graso, provocando daño de la bicapa lipídica, lo cual puede aumentar la permeabilidad del tejido, a este evento se conoce como lipoperoxidación (Birben *et al.* 2012). Este proceso ocurre en tres etapas, iniciación, propagación y terminación. En la primera etapa el radical hidroxilo captura un átomo de hidrógeno que formaba parte del enlace covalente del ácido graso dejando en la cadena un electrón no apareado generando con el electrón capturado la molécula de agua, posteriormente ocurre un re-arreglo molecular que da lugar a un dieno conjugado con un radical no apareado. El dieno reacciona con el oxígeno molecular y forma el radical peróxido ($ROO\bullet$), radical con la capacidad de atraer un hidrógeno del ácido graso poli-insaturado adyacente para formar hidroperóxido o conocido también como lipoperóxido ($ROOH$ o $LOOH$), esta molécula resultante genera una reacción en cadena con los siguientes ácidos grasos adjuntos, esto se conoce como la fase de propagación. Los hidroperóxidos o lipoperóxidos pueden formar diversos productos de lipoperoxidación debido a que son compuestos muy reactivos, dentro de los productos está el Malondialdehído molécula que marca el último paso de la lipoperoxidación (terminación) (Konigsberg, 2008). Por lo anterior para medir el daño oxidativo a nivel celular se puede usar como marcador del

daño al Tiobarbitúrico (TBA)-Malondialdehído (MDA), para conocer el nivel de daño causado por la lipoperoxidación y de esa forma saber cuánto daño oxidativo presenta la célula, esta medición se realiza con método indirecto de espectrofotometría o fluorometría o mediante el uso de HPLC directo (Grotto *et al.* 2009). En el resultado obtenido si la cantidad del MDA es menor existe mayor protección contra el daño oxidativo, si en contra parte existe mayor cantidad de MDA se infiere que hay daño oxidativo a nivel de la célula (Konigsberg, 2008). El daño que se produce en la célula afecta la bicapa lipídica lo que conlleva a una disminución de la fluidez, afectando la recepción hormonal, ocurriendo un rompimiento de la membrana celular por un daño en la permeabilidad membranal, todo lo anterior puede iniciar una respuesta inflamatoria (Konigsberg, 2008; Wong-ekkabut *et al.* 2007)

El daño en los ácidos nucleicos involucran la degradación de bases (purina, pirimidina) o en los enlaces con el azúcar, lo anterior genera mutaciones, deleciones o translocaciones (Birben *et al.* 2012; Phaniendra *et al.* 2015)

1.8 Fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes en humanos

El tratamiento de la diabetes debe cubrir los siguientes rubros: un cambio de estilo de vida, una alimentación adecuada a las necesidades, realizar ejercicio físico y el tratamiento farmacológico. Para el tratamiento farmacológico se muestran los principales fármacos usados en la cuadro 2

TABLA 2. Fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes.

Función	Tipo	
Aumentan la secreción de insulina independiente del nivel de glucosa	Sulfonilureas	clorpropamida, tolbutamida glibenclamida, glicazida, glipizida, glimepirida.
Disminuyen la resistencia a la insulina	Biguanidas	Metformina
Aumentan la secreción de insulina dependiente de la glucemia e inhibe la secreción de glucagón	Tiazolidinedionas	pioglitazona, rosiglitazona
Disminuir la glucemia y permitir la entrada de la glucosa al musculo	Inhibidores de DPP4 (enzima dipeptidilpeptidasa IV)	sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptin
	Agonistas del receptor de GLP1 (glucagon-like peptide 1)	exenatida, liraglutida
	Análogos de amilina	Pramlintida
	Insulina basal	insulina NPH
	Insulina prandial	insulina cristalina
	Análogos basales	glargina, detemir
	Análogos prandiales	lyspro, aspart, glulisina

(Reyes-Sanam *et al.* 2016)

De los medicamentos anteriores todos actúan sobre la hiperglucemia tratando de disminuirla pero ninguno actúa disminuyendo las especies reactivas de oxígeno o el estrés oxidativo por lo que las plantas medicinales constituyen una alternativa terapéutica para el tratamiento de la hiperglucemia y el estrés oxidativo.

1.9. Mecanismo de los métodos de inducción a diabetes mellitus

1.9.1. Aloxano

El aloxano es un derivado del ácido úrico, el cual en presencia de tiol intracelular como glutatión, es capaz de producir especies reactivas de oxígeno en una reacción cíclica con su producto reducido, el ácido dialúrico (Szkudelski, 2001). Las especies reactivas de oxígeno generadas afectan a la célula beta causando su destrucción por procesos que involucran la oxidación de grupos sulfidrilos, inhibición de glucocinasa y de radicales libres así como el desbalance de la homeostasis de calcio intracelular (Rohila y Ali, 2012).

También se ha descrito que la autooxidación del ácido dialúrico puede formar el radical superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo. Los radicales hidroxilo son los causantes de la disfunción y la muerte de la célula beta pancreática (El-Desouki *et al.* 2015). Otro mecanismo que favorece la diabetes causada por aloxano es que este último inhibe la secreción de insulina por su habilidad de inhibir la glucocinasa al oxidar esta proteína (Lenzen, 2007).

La inducción de diabetes por medio de aloxano, es un proceso que se ha descrito en 4 fases. La primera fase es conocida como fase de hipoglucemia transitoria, ya que aparece unos 30 minutos después de la inducción de aloxano, la hipoglucemia es el resultado de una estimulación de la secreción de insulina (hiperinsulinemia). La segunda fase aparece una hora después y se caracteriza por un aumento de la glucemia, generado por un estado de hipoinsulinemia, la duración de esta fase es de 2 a 4 horas. En la tercera fase ocurre un estado de hipoglucemia generado por la hiperinsulinemia, en esta fase los daños a nivel pancreáticos son irreversibles, esta fase inicia de 4 a 8 horas después de la inducción de aloxano. La última fase se caracteriza por una hiperglucemia permanente caracterizando a la diabetes, el daño que se ha descrito es que ocurre una degranulación completa de la célula beta característica de la diabetes tipo 1, pérdida de la integridad de las células beta lo que genera desechos celulares los cuales se eliminan por macrófagos, estos desechos celulares pueden favorecer un estado proinflamatorio. A nivel pancreático las células alfa y gamma no pierden su integridad, por lo cual se ha visto que el aloxano es específico para las células beta. Generando la diabetes de tipo uno (Rohilla y Ali, 2012).

1.9.2. Alimentación con Fructosa

La fructosa es un monosacárido cuya estructura química es de 6 carbonos con una cetona en el segundo carbono (Tran *et al.* 2009) que a diferencia de la glucosa es una pentosa, este monosacárido se encuentra en frutas, verduras, en la miel, en alimentos industriales. (Riveros *et al.* 2014). La fructosa en un modelo animal es la desencadenante de resistencia a la insulina, hipertensión, estrés oxidativo, aumento del ácido úrico, hiperinsulinemia,

hipertrigliceridemia, síndrome metabólico. Los efectos dependen de la cantidad y duración del consumo de fructosa. La resistencia a la insulina, crea un estado de hiperglucemia a nivel sistémico acompañado de una sobreproducción de insulina (hiperinsulinemia), este estado cuando su duración es prolongada genera en el organismo al diabetes mellitus tipo 2 (Tran *et al.* 2009). Cuando el animal experimental tenga este tipo de diabetes el tratamiento farmacológico será la administración de metformina, el efecto de esta biguanida es favorecer la secreción de insulina, otros efectos son la reducción de los almacenes hepáticos de glucosa, así como disminuir la absorción intestinal de glucosa y aumentar la captación de glucosa por tejidos periféricos como musculo esquelético y adipocitos, inhibir la gluconeogénesis, hay estudios donde se menciona que metformina puede inhibir la cadena respiratoria en la mitocondria específicamente el complejo. Algunos estudios muestran que la dosis del 10%, aplicada durante 4 meses, aumenta los niveles de triglicéridos e insulina, pero no glucosa (Parvaneh-Tafreshi *et al.* 2010). Se ha descrito el uso de porcentajes más altos, 66% durante 2 semanas para poder caracterizar al receptor de la insulina a nivel de los tejidos y ARNm, donde se describió que el número de receptores de insulina y los niveles del ARNm disminuyeron de forma significativa en el musculo esquelético y a nivel hepático con este porcentaje de fructosa (Catena *et al.* 2003). En otro estudio se utilizó el 60.3% de fructosa durante 9 semanas, donde se observó que genera hiperinsulinemia, alteración de la tolerancia a la glucosa e hipertrigliceridemia pero sin cambios en la presión arterial. Así como un aumento del estrés oxidativo (Oudot *et al.* 2009). En un periodo de tiempo similar, se reporta que una administración de 60% incrementan los triglicéridos sanguíneos (Vasiljević *et al.* 2014). Otros efectos reportados es el aumento nuclear de proteína de unión al elemento regulador del estero (SREBP-1) y FoxO1, proteínas y ADN unido a proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) (Koo *et al.* 2009). Se ha reportado que después de la administración oral aproximadamente el 4.39% no es absorbido y la biodisponibilidad es de aproximadamente el 30%, (Choi *et al.* 2006, 2008).

Algunos efectos negativos descritos por la fructosa son el daño renal, donde se sabe que de forma normal el riñón es el órgano de excreción de glucosa, en la filtración glomerular se reabsorbe la glucosa a la sangre por el túbulo renal. Solo una parte mínima permanece en la orina. Sin embargo la absorción en los túbulos renales está limitada. Cuando la glucemia es mayor de 160-180 mg/dL, las células epiteliales del túbulo proximal alcanzan el límite de absorción de glucosa y no puede absorberse la cantidad total, por lo que se excreta en orina causando la glucosuria. La concentración mínima de glucemia a la que empieza a parecer la glucosa en orina se conoce como umbral renal para la glucosa. Cuando se excede este umbral la glucosa aparece en orina (Yin *et al.* 2017).

Uno de los daños más descritos generados por la fructosa es a nivel del riñón donde se ha descrito sobre la presencia de proteinuria lo que sugiere una manifestación de un mal funcionamiento metabólico agudo de la diabetes, más que una alteración estructural del riñón (Pennell *et al.* 1981). Así como el desarrollo de la glomerulopatía diabética la cual se atribuye a una extravasación de proteínas plasmáticas a través de los capilares glomerulares y su acumulación en el mesangio. Por otra parte se propone que la glicosilación no enzimática de proteínas proporciona el vínculo entre la hiperglucemia y la anomalía estructural y funcional del riñón en la diabetes (Pennell *et al.* 1981).

Los daños causados por la diabetes incluyendo el aumento del estrés oxidativo son el objetivo primordial en el tratamiento de la enfermedad, por lo que se han buscado fuentes alternas y se ha observado que las plantas medicinales pueden aportar nuevas alternativas gracias a sus compuestos generados por su metabolismo.

1.10. Síntesis de los metabolitos secundarios de las plantas

Los metabolitos secundarios o componentes secundarios de la planta se dividen en 3 grupos dependiendo de su estructura y las vías de su biosíntesis; compuestos fenólicos, terpenoides y componentes que contienen de nitrógeno (Borrelli y Trono, 2016). El proceso de generación de compuestos secundarios empieza en la vía del shikimato, la cual

produce 3 aminoácidos aromáticos esenciales, L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina, estos sirven en la planta para sintetizar proteínas, así como también son precursores de pigmentos, alcaloides, hormonas y componentes de la pared celular (Maeda y Dudareva, 2012). Esta vía inicia con la conversión de 2 metabolitos, el PEP (fosfoenolpiruvato) de la vía de la glicolisis y la E4-P (eritrosa-4-fosfato) en chorismato, este es el punto inicial para la síntesis de los aminoácidos aromáticos y los metabolitos secundarios derivados de esta vía, el proceso implica 7 reacciones catalizadas por 6 enzimas. El chorismato es el metabolito final de la vía de shikimato y funciona como iniciador de la síntesis de los tres aminoácidos aromáticos (Tzina y Galili, 2010).

La fenilalanina, es precursor de los fenilpropanoides, flavonoides, glicosinolatos, lignina de la pared celular y antocianinas. La tirosina es precursor de los tococromanoles (tocoferoles y tocotrienoles), plastoquinones, isoquinolina alcaloides, aminoácidos no proteicos y algunos fenilpropanoides. En algunas plantas algunos componentes secundarios de la vía de los fenilpropanoides no se sintetizan a partir de la fenilalanina, sino de la tirosina. Por último el triptófano es catabolizado en varios metabolitos secundarios como Indol-3-acético, indol-glicosilatos, fitoalexinas, terpenoides, indol-alcaloides y derivados de triptamina (Tzina y Galili, 2010).

La combinación de la vía del malonato y del shikimato, produce flavonoides. La condensación y reacciones de polimerización producen taninos condensados, lignanos, cutina y suberina. Los terpenos y terpenoides derivan de un precursor común, el isopentilfosfato (IPP), el cual es ubiquitinizado a través de la vía de mevalonato, la condensación del IPP con pirofosfato de dimetilalilo, genera pirofosfato de geranilo, el cual es el precursor de los monoterpenos. Los compuestos que contienen nitrógeno son derivados de los aminoácidos alifáticos, los ejemplos de estos compuestos son los alcaloides y los glucosinolatos alifáticos (Borrelli y Trono, 2016). Lo anterior queda explicado en la figura 1.

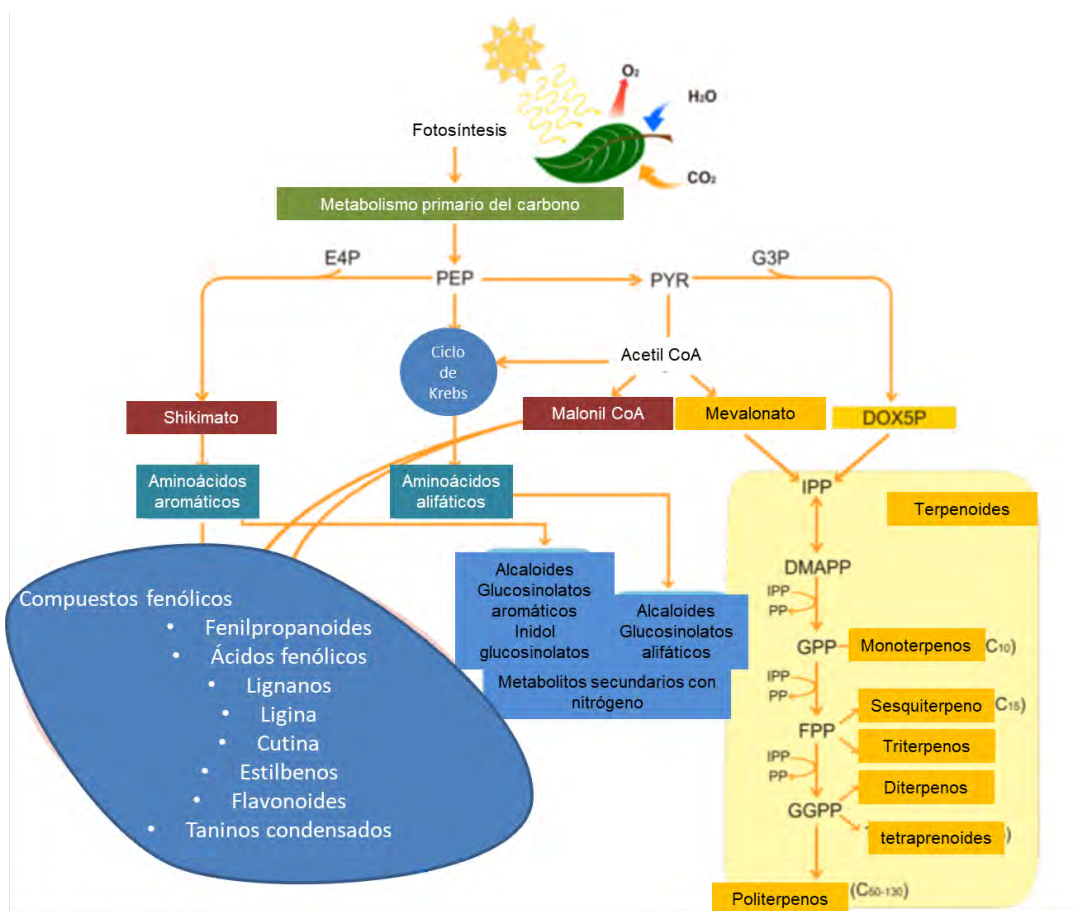


Figura 1. Representación esquemática de la biosíntesis de metabolitos secundarios. (Borrelli y Trono, 2016).

1.11 Biodisponibilidad de los compuestos secundarios de las plantas

Los compuestos fenólicos en las plantas se encuentran en forma de ésteres, glicósidos, polímeros o como agliconas, por lo que necesitan de ser hidrolizados para su absorción, la cual sucede en diferentes regiones del organismo (Dryden *et al.* 2006; Talavéra, 2003)

La digestión de los polifenoles inicia desde la vía oral, donde el proceso de masticación (Dryden *et al.* 2006) y la secreción de saliva al igual que la microbiota tienen actividad β -glucosidasa, reduciéndolos a su forma simple (agliconas) (Dueñas *et al.* 2015). En el estómago los glicósidos resisten las secreciones gástricas, aunque existen reportes de que algunos compuestos como la quercetina y las antocianinas pueden absorberse en esa

región (Talavéra *et al.* 2003; Cardona *et al.* 2013). Lo anterior permite inferir que cuando los compuestos se encuentran en forma de aglicona es posible la absorción a nivel gástrico. Sin embargo la absorción en el intestino delgado es mínima, se ha reportado que las concentraciones a nivel del lumen son mayores a las encontradas en la concentración del suero (Ozidal *et al.* 2016).

La absorción a nivel intestinal de polifenoles es de 5-10% (Marín *et al.* 2015; Del rio *et al.* 2013), las enzimas implicadas son β -glucosidasa y lactasa-floricina hidrolasa, esta última ubicada en la membrana del enterocito (Favari *et al.* 2013; Pietta *et al.* 2003) mostrando una especificidad para flavonoides O- β -D-glicósidos. Sin embargo, no presentan acción sobre los compuestos unidos a la ramnosa (Van Duynhoven *et al.* 2011). Cuando un polifenol llega al intestino en su forma monomérica (aglicona) o como estructura de dímero se absorben por difusión pasiva, al interior del enterocito por su propiedad lipofílica (Marín *et al.* 2015; Angelino *et al.* 2017).

Las formas más complejas como los polifenoles oligoméricos y poliméricos (taninos condensados o hidrolizable) llegan al colon donde son degradadas por la microbiota intestinal (Marín *et al.* 2015), el porcentaje que llega a esta región es 90-95% (Marín *et al.* 2015; Del rio *et al.* 2013). Siendo diferentes las formas plasmáticas a las encontradas en sus fuentes. La absorción se ve afectada por la estructura química, grado de glicosilación, circulación enterohepática y el porcentaje que alcanza al colon (Pietta *et al.* 2003). La microbiota intestinal presenta la capacidad de hidrolizar glicósidos a su forma simple (agliconas) al provocar la apertura del anillo heterocíclico, metabolizando diferentes ácidos para generar ácido benzoico, equol, enterolactona y enterodiol. Los cuales pueden presentar efectos agonistas o antagonistas sobre los estrógenos (Favari *et al.* 2013). A este nivel las enzimas α - rhamnosidasa de la microbiota son secretadas por *Bifidobacterium dentium*, las cuales producen la separación de los polifenoles que están unidos con ramnosa (Marín *et al.* 2015; Pietta *et al.* 2003).

Los polifenoles se metabolizan en dos etapas, fase I y fase II; en la primera ocurren procesos de oxidación, reducción e hidrólisis, conduciendo a una reducción del número de grupos hidroxilo, al adicionar sulfato, ácido glucorónico o grupos metilos a la estructura, modificando al compuesto favoreciendo un aumento en la polaridad y su propiedad hidrofílica, lo anterior torna al compuesto más soluble, facilitando su excreción a través de la orina (Marín *et al.* 2015; Dryden *et al.* 2006). En la segunda fase ocurren procesos de conjugación, que pueden desarrollarse al interior del enterocito y del hepatocito, generando como producto metabolitos conjugados (derivados de metilo, glucurónido y sulfato), los cuales se liberan en la circulación sistémica para su distribución a órganos y excreción por orina o heces. La mayoría de las mediciones están limitadas debido a que son semicuantitativas por que no toman en cuenta el balance entre el consumo con lo eliminado de estos compuestos secundarios de las plantas. (Bohn, 2014; Pressman *et al.* 2017).

Una vez que el compuesto llega a nivel intracelular, a través de los transportadores SGLT1, el glicósido se hidroliza por la β -glucosidasa citosólica (CBG) (Angelino *et al.* 2017; Bohn, 2014). Los compuestos encontrados de forma intracelular entran en procesos de detoxificación donde sufren cambios por procesos de metilación, sulfatación y glucuronidación mediante enzimas como catecol-O-metiltransferasas (COMT), sulfotransferasas (SULT) y por uridina-5-difosfato-glucuronosiltransferasas (UGT), respectivamente, otras enzimas descritas son las N-acetil-transferasas (NAT's), glutatión-S-transferasas (GST's) y tiopurina-S-metil-transferasa (TPMT) (Dryden *et al.* 2006; Angelino *et al.* 2017). Esta aglicona se biotransforma por enzimas de fase II en metabolitos conjugados (glucurónidos, O-metileteres y sulfatos) dentro del enterocito y a nivel hepático (Marín *et al.* 2015). Lo explicado anteriormente es parte de la fase II al interior del enterocito. De tal forma que los compuestos que llegan a los tejidos son químicamente y funcionalmente diferentes a las ingeridas (D'Archivio *et al.* 2010).

Posteriormente el metabolito pasa a la periferia, donde se une a proteínas plasmáticas (albumina), la afinidad de los polifenoles a las proteínas puede ser alta como en el caso de la apigenina y quercetina (90%) y menor como la epicatequina (10%) (Bhattacharyya *et al.* 2014). De ahí el compuesto puede ingresar a los tejidos (hepático, estomacal, intestinal y nefrítico) donde es metabolizado o transportado a los tejidos diana (pulmonar, pancreático, cerebral, cardiaco y esplénico). Los metabolitos llegan al hepatocito a través de la vena porta, en este nivel pueden someterse a metabolismo de fase II por procesos de glucuronidación, metilación, sulfatación o una combinación de estos, los metabolitos de esta fase pueden pasar a la circulación enterohepática, permitiendo la recaptación y biodisponibilidad (Marín *et al.* 2015; Bohn *et al.* 2014), al llegar al intestino a través de la secreción biliar (Ozidal *et al.* 2016; Del río *et al.* 2013). Al proceso en el cual los metabolitos se reciclan en el lumen intestinal o en la sangre periférica para llegar al hígado, se le conoce como la fase III del metabolismo. En esta fase el reflujo o reciclado de polifenoles es facilitado por la Atp-Binding-Cassette (ABC, transportador de membrana), la proteína de resistencia a multidroga 2 (MRP-2, proteína apical y de lumen) y (MRP-1, transportador basolateral) (Dryden *et al.* 2006).

Por último la eliminación de estos compuestos es por vía biliar o urinaria. Además se ha reportado que los metabolitos fenólicos pueden eliminarse a través de las heces (Pressman *et al.* 2017; Van Duynhoven *et al.* 2011). El proceso anterior se esquematiza en la figura 2.

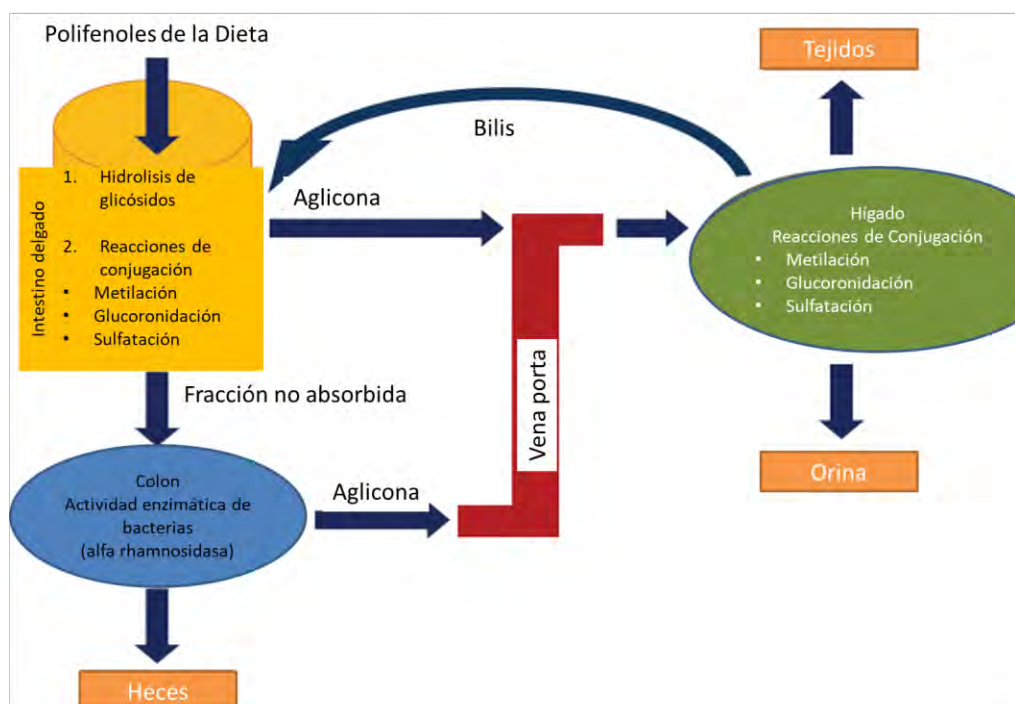


Figura 2. Rutas de absorción y metabolismo de polifenoles dietéticos y sus derivados. (Marín *et al.* 2015)

Es importante tener en cuenta que la biodisponibilidad de cada polifenol es diferente y no tiene relación con la cantidad ingerida. Como se menciona anteriormente, la biodisponibilidad del total de polifenoles ingeridos por la dieta solo 5-10% se absorbe en el estómago y el intestino delgado en un tiempo de 30 min a 2 h y el otro 90-95% se absorbe en el intestino grueso 6-8 h (Skibola y Smith, 2000). A nivel del plasma se ha reportado que la concentración raramente excede 1 μM después de haber consumido de 10 a 100 mg de un mismo compuesto (Acalbert y Williamson, 2000).

1.12 Efecto antioxidante de las plantas en el estrés oxidativo

Los reportes de las funciones antioxidantes de las plantas son varios, dentro de los cuales se destacan las siguientes actividades: inhibición de la reabsorción de glucosa renal, estimulación de la secreción de insulina por la célula beta, inhibir el proceso de degradación de la célula, reducir la resistencia a la insulina, aumento del número y

tamaño de las células en los islotes de Langerhans, estimular la glucogénesis y la glucólisis a nivel hepático y funciones protectoras a la célula beta contra el estrés oxidativo (Oyagbemi *et al.* 2014). Lo anterior es realizado por varios compuestos activos (metabolitos secundarios) como los flavonoides, estilbenos, lignanos y ácidos fenólicos de los cuales se describirán algunos a continuación.

Los polifenoles se definen como sustancias no energéticas que están presentes en alimentos de origen vegetal resultantes del metabolismo secundario de las plantas como mecanismo de defensa a rayos ultravioleta, agresión de patógenos (Bhooshan y Ibrahim, 2009). En los alimentos proporcionan características organolépticas como el color, sabor, aroma y estabilidad oxidativa (Bhooshan y Ibrahim, 2009). Los polifenoles tienen actividad protectora en diversas enfermedades como la diabetes, el cáncer, hipertensión, la inflamación. La clasificación de los polifenoles es en base al número de anillos que contienen en su estructura, dentro de la división estructural se encuentran a los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y los lignanos. (Bhooshan y Ibrahim, 2009). La acción de los polifenoles a nivel celular se ha descrito que pueden interactuar con los receptores o enzimas involucradas en la traducción de señales, esto se traduce en la modificación del estado de oxidación de la célula, este proceso puede desarrollar reacciones dependientes de la oxidación (Scalbert *et al.* 2005).

Los flavonoides son polifenoles cuya estructura está compuesta por dos anillos fenilos unidos por un anillo pirano, formando un esqueleto difenilpirano, con una configuración química $C_6-C_3-C_6$ (Quiñones *et al.* 2012). Cada anillo se numera con las letras A, B y C. A su vez estos se pueden clasificar de acuerdo a las variaciones en su estructura en: antocianidinas, flavonas, flavonoles y flavanos. Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes debido a que son secuestradores de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, inhiben enzimas oxidasas. (Escamilla *et al.* 2009). Estructuralmente los flavonoides presentan O-dihidroxi en el anillo B dándole mayor estabilidad a su forma

radical la cual participa en la deslocalización de electrones. Se ha descrito que los flavonoides recogen el oxígeno reactivo en el estado de anión superóxido, hidroxilos y peróxidos de hidrogeno, bloqueando el efecto de estas especies reactivas de oxígeno en la célula (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

Otros compuestos antioxidantes son la quercetina que es un flavonol de la familia de flavonoides, cuya función reportada es la prevención del estrés oxidativo al eliminar los radicales libres, inhibiendo la peroxidación de lípidos, reduce la absorción intestinal de glucosa al inhibir el GLUT2 en las células intestinales CaCo-2 (Oyenihi *et al.* 2014). En el páncreas aumenta la secreción de insulina y disminuye el daño por estrés oxidativo. En el musculo aumenta los receptores de insulina lo que favorece la captación de glucosa por el tejido muscular así como estimular la translocación de los GLUT4. Lo anterior se traduce en una disminución de la glucemia y mejor control de la diabetes (Oyenihi *et al.* 2014).

1.13 Efecto hipoglucemiante en las plantas

Los extractos de las plantas mediante los compuestos secundarios pueden favorecer la homeostasis de la glucosa. Uno de los compuestos más descritos son los polifenoles, que presentan la capacidad de inhibir el transporte de glucosa por GLUT2, SGLT1 y SGLT2 en el intestino delgado (Hanhineva *et al.* 2010; Murugan *et al.* 2015). En esta misma región anatómica se ha descrito la capacidad de inhibir la actividad de enzimas como α -amilasa y α -glucisidasa, con lo que se disminuye la absorción intestinal de glucosa (Kim *et al.* 2016). Incluso son capaces de controlar la hiperglucemia mediante una respuesta asistida y síntesis de GLP-1 y péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) (Murugan *et al.* 2015). Otras propiedades descritas son el aumento de la actividad de glucocinasa y la producción de glucógeno en el hígado, así como un incremento de los niveles plasmáticos de insulina (Bahadoran *et al.* 2013). Así como también promover la translocación de GLUT4 lo que aumenta la captación de glucosa en los tejidos periféricos (Kim *et al.* 2016). En la figura 3. Se pueden apreciar los efectos que favorecen la homeostasis de la glucemia.

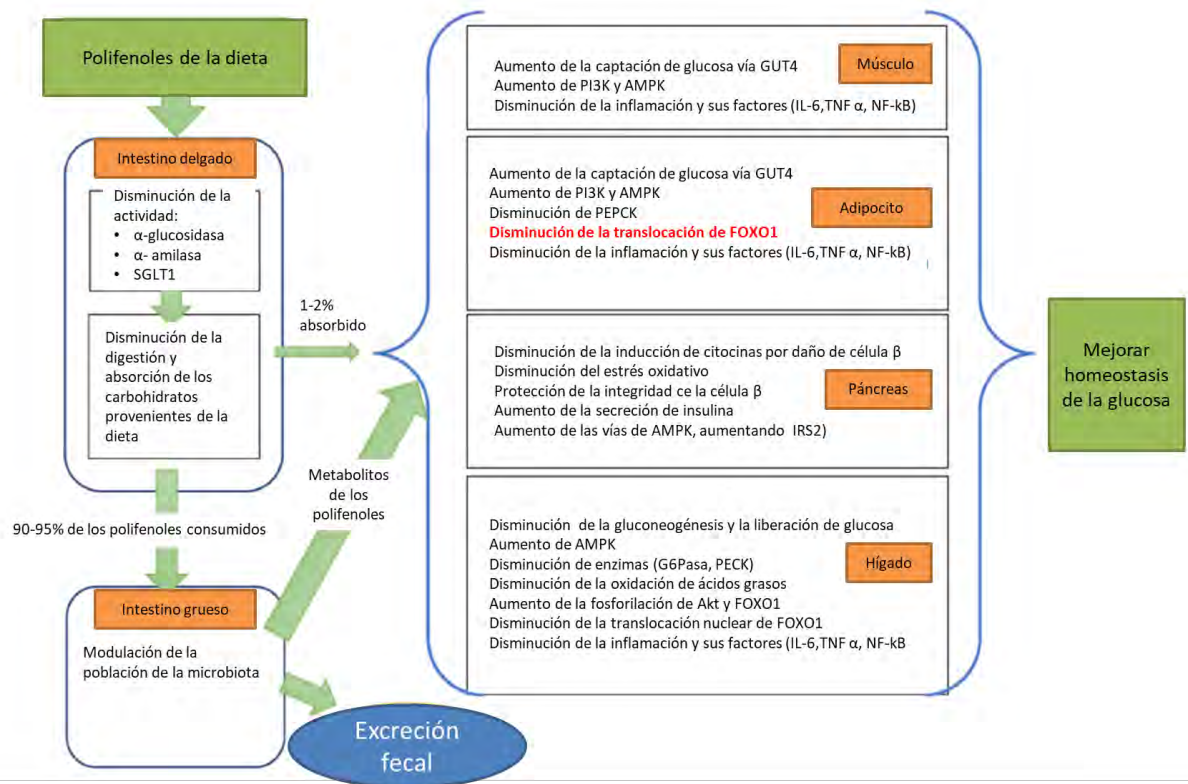


Figura 3. Mecanismos potenciales de los polifenoles en la homeostasis de la glucosa.
(Kim *et al.* 2016)

1.14 Categoría taxonómica de *Cuphea procumbens*

Las Categoría taxonómica superiores descritas para la planta son:

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flore)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Rosidae

Orden: Mytrales

Familia: Lythraceae

Especie: *Cuphea procumbens* Ortega

1.15 Descripción

La planta *Cuphea procumbens* pertenece a la familia Lythraceae conocida también por el nombre de hierba de la calavera (Arizaga, 2007), hierba del cáncer, nube azul, atlanchana, macachampa de milpa y pegajosa. Los nombres purépechas que recibe son Calaver tsistiki cuya traducción sería "flor calavera" y Azul tsitsiki que significa "flor azul". Según datos de la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana la planta es procedente de México, encontrándose distribuida en diferentes estados como: Chihuahua, Colima, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas. Aquí en el estado de Michoacán se puede encontrar en los municipios de: Álvaro Obregón, Charo, Churintzio, Coalcomán, Erongáricuaro, Huaniqueo, Huetamo, Jiquilpan, La Piedad, Maravatío, Morelia, Pátzcuaro, Tuxpan, Tzintzuntzan, Uruapan, Zinápecuaro, Zitácuaro (Arizaga, 2007).

El hábitat donde se encuentra la planta son campos cultivados de suelo húmedo, en orillas de caminos, campos bajos inundables y al margen de los ríos.

Los datos de la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana especifican que la hierba tiene una altura aproximada de 20-60 cm de largo, el cual es muy ramificado, el tallo tiene presencia de pelos que pueden ser blancos o morados. La hoja puede tener forma angosta con los márgenes ligeramente enrollados hacia debajo de 7 cm de largo y de 7-15 mm de ancho. Las flores son velludas de color púrpura (Arizaga, 2007), concentradas en la parte superior de los tallos. La planta se emplea para el catarro, el empacho y el cáncer. Otro uso descrito es como planta melífera. En el estado de Michoacán se utiliza como hipoglucemiante.

II. Justificación

En la patología de la diabetes se ha observado un aumento del estrés oxidativo a nivel celular lo que lleva a una disminución del sistema de defensa antioxidante, causando un aumento de radicales libres los cuales dificultan la acción de la insulina periférica, generando un deterioro de las células beta del páncreas, creando un estado de hiperglucemia, lo anterior debido a la disminución de antioxidantes (Cuerda *et al.* 2011). Esto lleva a intuir que la alimentación juega un papel importante para prevenir la producción de radicales libres lo que genera un nuevo campo de búsqueda para alternativas terapéuticas (Acalbert y Williamson, 2000).

Con el paso de los años, la tasa de prevalencia y mortalidad de diabetes tuvo un aumento drástico. Durante 1999 la diabetes se ubicó en la tercera causa de muerte en México (Altagracia-Martínez *et al.* 2007). En el 2016 estuvo en la primera causa de muerte. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes México es uno los 10 países con mayor número de adultos con diabetes en orden descendente son China (ocupando el primer lugar), India, Estados Unidos de América, Brasil, Federación Rusa, México, Indonesia, Egipto, Japón y Bangladesh (ocupando el último lugar). Como vemos en la lista anterior México se ubica en el sexto lugar de la lista. La ENSANUT 2012 (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) indicó que en nuestro país había 6.4 millones de adultos que padecían diabetes de un total aproximado de 116.9 millones de habitantes. Actualmente de un total de 119 millones de habitantes, 12.5 millones son adultos padecen diabetes (FID, 2017). Es decir que aumentaron en 3 años aproximadamente 5 millones de personas en nuestro país con diabetes, junto a esto se incrementó la mortalidad debido a este padecimiento. Aunado a lo anterior el poco apego del paciente al tratamiento genera complicaciones a largo plazo las cuales deben ser prevenidas y tratadas de forma temprana para contrarrestar los efectos negativos de la enfermedad. Dicho lo anterior se conoce que todos los fármacos para el tratamiento de la diabetes tienen buenos resultados en el control de la glucemia, pero se desconoce si tienen efectos antioxidantes u efectos que eviten la aparición de radicales libres, los cuales pueden intervenir en el

daño a la célula que puede afectar desde el ácido desoxirribonucleico (DNA) hasta distintas macromoléculas. Lo cual nos hace ver la urgencia por encontrar alternativas terapéuticas que sean de fácil acceso a las personas con diabetes, siendo una opción de terapia de apoyo las plantas medicinales.

En el trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, se demostró que el uso de plantas medicinales disminuye el estrés oxidativo al bajar los niveles de especies reactivas de oxígeno por los diferentes compuestos antioxidantes de las plantas (Vargas-Vargas, 2016), sin embargo, no hay información o registros acerca de la *Cuphea procumbens* conocida como hierba de la calavera que se utiliza comúnmente en Morelia para tratar la diabetes mellitus.

III. Hipótesis

La planta *Cuphea procumbens* ejerce un efecto hipoglucemiante y antioxidante en animales diabéticos.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto hipoglucemiante de la administración oral de *Cuphea procumbens* en animales diabéticos.

4.2. Objetivos Particulares

- 1 Evaluar las concentraciones de polifenoles, flavonoides y fenoles.
- 2 Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* en los extractos acuosos, acetónicos y alcohólicos.
- 3 Comprobar la actividad hipoglucemiante y estandarizar la dosis óptima de extractos de *Cuphea procumbens*.
- 4 Evaluar la capacidad hipoglucemiante de forma aguda y crónica.

V. Material y métodos

5.1. Obtención e identificación de la planta *Cuphea procumbens*

La planta se obtuvo en la calle Ortiz Rubio en Charo, Michoacán (19°44'36.4"N 101°02'39.5"W) lugar donde se realizó la recolección de la planta. La identificación, clasificación y el número de folio fueron proporcionados por el instituto de biología de la Universidad Nacional Autónoma De México (Anexo 1).

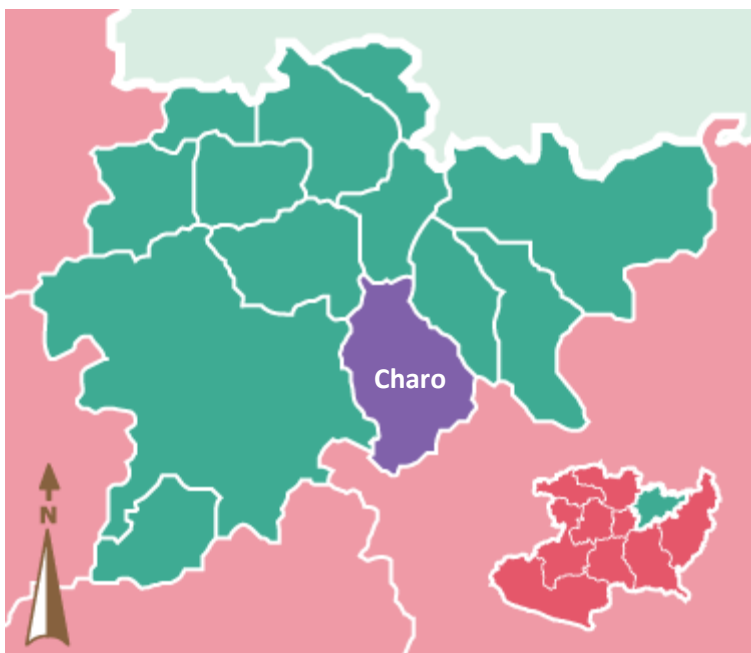


FIGURA 4. Ubicación geográfica del municipio de Charo.

5.2. Obtención del extracto acuoso

Las hojas de *Cuphea procumbens* se homogenizaron con agua destilada, se filtraron y centrifugaron a 3000 rpm por 30min, obteniéndose el sobrenadante, al que se le llamo extracto acuoso.

5.3. Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos

Se realizaron al extracto acuoso lavados de acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$) y etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) como disolventes orgánicos para remover los pigmentos contenidos en las hojas de la planta y con ello, todos los componentes activos a los que se les atribuyen diversas

funciones biológicas como alcaloides, glúcidos y otros componentes propios de la planta (Bermúdez, 2009). Los pigmentos de los solventes orgánicos utilizados por destilación simple y evaporación para su posterior uso.

5.5 Mediciones realizadas a los extractos de *Cuphea procumbens*

5.5.1. Contenido de polifenoles

El análisis de polifenoles totales se realizó por el método descrito por Singleton y Rossi (1965) en el cual se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu. El extracto de la planta maneja pH básicos, por lo que se redujo con ácido acético glacial. Una parte de la muestra se trató con PVPP insoluble (polivinilpolipirrodilona), para evitar las interferencias, en un medio ácido el reactivo se une a los polifenoles permitiendo una lectura más eficiente. Por último se adiciono Na_2CO_3 al 20%. Las disoluciones se mantienen en oscuridad durante 1 hora, posterior a esto se procede a la lectura en el espectrofotómetro a 760nm. Se elaboró la curva de calibración con floroglucinol. Los resultados se interpolaron en la muestra problema expresándolos en mg equivalentes de floroglucinol (FGE) por 100 g de la planta.

5.5.2 Contenido de flavonoides

Se cuantificaron los flavonoides con el método de Dowd, el cual consiste en mezclar el control (quercetina) o la muestra problema con el extracto de la planta, con tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 10%, acetato de potasio (CH_3COOK 1M) y agua destilada. Se dejaron en incubación por 30 min. Al termino del tiempo se leyeron la absorbancia a 415 nm en espectrofotómetro manual (Jenway Modelo 6305). Los valores de la muestra problema se interpolaran en la curva patrón de quercetina. Y el total de flavonoides se expresara como gramos equivalentes de quercetina (QE) por gramo de la planta.

5.5.3 Ensayo de la actividad antioxidante

En esta prueba, se realiza la evaluación de la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar al radical DPPH, este es un compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

cuya capacidad de absorber radiación es a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos. En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante a este radical (Bondet y Brand-Williams, 1997). La concentración utilizada de DPPH fue de 20 mg/L. Se evaluó la actividad antioxidante de la flor y hoja en los extractos; acuoso, acetónico y alcohólico. Como control se realizó una curva de calibración de ácido ascórbico. El cálculo del % de DPPH remanente se calculó de la siguiente forma: $\% \text{ DPPH}_{\text{rem}} = 100 * \text{DPPH}_{\text{rem}} / \text{DPPH}_{\text{inicial}}$

Los resultados se analizan por regresión del porcentaje remanente contra la concentración necesaria de la muestra para disminuir el 50% del radical (EC50), también se expresan como el tiempo necesario para inhibir el 50% de la concentración del radical (TEC50). Al tomar en cuenta los dos valores anteriores surge el parámetro eficiencia antiradical (AE), que combina las 2 variables ($AE = 1 / (EC50 \times TEC50)$) (Sanchez-Moreno, *et al.* 1998). De igual forma se calcula el poder antiradical (ARP), mediante la siguiente formula $ARP = 1/EC50$ (Brand-Williams, *et al.* 1995)

5.6. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar a partir de un peso de 250g, 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*.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (publicación NIH nº 80-23, 1996). Se llevaron a cabo las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

5.7. Inducción de Diabetes Experimental

5.7.1 Diabetes tipo 1 con aloxano

Los animales se mantuvieron en ayuno por un período de 12 h, posterior a esto se administró de forma intraperitoneal el aloxano (Sigma St. Louis Mo., USA) 200 mg/Kg peso corporal en solución salina al 0.9% de NaCl. Después de la inyección tendrán libre acceso a comida y agua, una hora después de la administración.

Se consideró a los animales diabéticos al presentar una glucemia (evaluada con un glucómetro ACCU-CHEC) mayor de 180 mg/dL, 24h después de la administración de aloxano.

Una vez que se confirma la diabetes mellitus de tipo 1, el tratamiento del animal es con insulina exógena (insulina Lantus).

5.7.2 Fructosa

La fructosa se administró de forma oral siendo diluida en agua en una concentración del 60% de fructosa. Se permitió al animal un acceso *Ad libitum*. Para que el consumo fuera diario. Se comprobó la diabetes mellitus tipo 2 mediante el diagnóstico de hiperglucemia, realizado con el Accu-Chec performa. Además de un análisis de orina y corroborar la presencia de HbA1c para confirmar el establecimiento del modelo.

5.8 Medición de la hemoglobina glicosilada

Se evaluó la hemoglobina glicosilada utilizando kits de SDA1cCare, basado en inmunocromatografía y fotometría de reflectancia en muestras capilares o venosas, siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit. El fundamento es el uso de anticuerpo antiHbA1c específico para residuos de aminoácidos del extremo N terminal glicado de la cadena β de la hemoglobina. Al agregar la sangre en la solución tampón, los eritrocitos se lisan para liberar la hemoglobina glicosilada (HbA1c), al poner la muestra en

el panel de prueba, el fluido de la mezcla migra por la membrana de panel de prueba de acción capilar, inmovilizando la hemoglobina glicosilada en la línea recubierta con anticuerpo anti-HbA1c. Se mide la intensidad del color de la hemoglobina que está en la membrana del panel de prueba, en donde se produce la reacción química e inmunológica producida en el panel de prueba por el sistema óptico del aparato. Los valores obtenidos se expresan en porcentaje y mg/dL. Basados en los criterios de NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program). Se consideran diabéticos cuando los valores son >6.5%.

5.9 Parámetros para evaluar el efecto hipoglucemiante en plantas

Para la medición del efecto hipoglucemiante se utilizara la curva de glucosa en ayuno, la curva de tolerancia a la glucosa. La primera consiste en medir la glucosa a los 0, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos para cuantificar el nivel de glucemia siendo útil para evaluar la si el extracto de la planta favorece la gluconeogénesis hepática. El segundo tipo de medición se utiliza para evaluar el metabolismo de carbohidratos, comprobar la actividad o el efecto de los extractos, así como determinar la dosis y el tiempo a la que el efecto resulta efectivo, este método consiste en administrar una carga de glucosa de 1.5g/kg al animal, posterior a esto se administra el tratamiento con la planta tras lo cual se mide la glucemia a los 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos tanto a ratas sanas como hiperglucémicas (n=6 cada grupo) (Attanayake *et al.* 2013).

5.10 Diseño Experimental

5.10.1 Administración aguda del extracto

Basados en las guías de toxicidad de la OECD/OCDE (407 y 408) se establecieron diferentes dosis para encontrar la que presenta el mejor efecto hipoglucemiante de los extractos de *Cuphea procumbens*, en dos diferentes pruebas; curva de tolerancia a la glucosa oral y la curva de glucosa en ayuno con una duración de 360 minutos (Ernsberg y Koletsky, 2012), para realizar las dos pruebas se distribuyeron los animales del modelo de aloxano (DM1) y el modelo de fructosa (DM2) en 5 grupos de 6 animales cada uno.

TABLA 3. Distribución grupos administración aguda

Grupo	DM1(Modelo con Alozano)	DM2 (Modelo con Fructosa)
Grupo I	Control sanos	Control sanos
Grupo II	Hiperglucemicos + Solucion salina	Hiperglucemico + solución salina
Grupo IV	Hiperglucemico + Insulina	Hiperglucemico + Metformina
Grupo V	Hiperglucemica + Extracto acuoso de <i>Cuphea procumbens</i>	Hiperglucemica + Extracto acuoso de <i>Cuphea procumbens</i>

5.10.2 Administración crónica

Al confirmar cual es la dosis óptima de acuerdo al efecto hipoglucemiante observado, este se utilizó para la administración crónica, para ello se realizó la administración por un periodo de 12 semanas del extracto acuoso de *Cuphea procumbens* y se distribuyeron los animales de la siguiente forma:

TABLA 4. Distribución grupos administración crónica.

Grupo I	Control animales sanos + Extracto Acuoso <i>Cuphea procumbens</i>
Grupo II	Diabetes Mellitus II + Metformina
Grupo III	Diabetes Mellitus II + Extracto acuoso de <i>Cuphea procumbens</i>

Durante el periodo de administración crónica se realizó medición de diferentes parámetros antropométricos una vez por semana hasta que se completó el periodo. De igual forma se cuantificaron los niveles sanguíneos de glucosa utilizando el glucómetro (Accu-Chek® Performa) cada semana durante el periodo experimental.

Al término del periodo experimental, los animales se sacrificaron 24 horas posteriores al último tratamiento con una dosis alta de pentobabital sódico (150 mg/kg).

El uso de animales, las instalaciones donde estarán, las técnicas experimentales, la movilización de ellos, así como medidas de bioseguridad del personal involucrado con el cuidado y uso de los animales de laboratorio, cumple con lo dispuesto en la norma oficial mexicana: NOM-062-ZOO-1999, y 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 nº 80-23, 1996).

VI. Análisis estadísticos

Las bases de datos se crearon en Excel, el análisis estadístico fue de tipo descriptivo con un análisis ANOVA seguido de un post-hoc Tukey. Las variables estudiadas se describen por grupos utilizando la media y la desviación estándar. Se considera significativo cuando $p < 0.05$. Lo anterior se realizó con el paquete de datos estadístico GraphPad Prism 7.

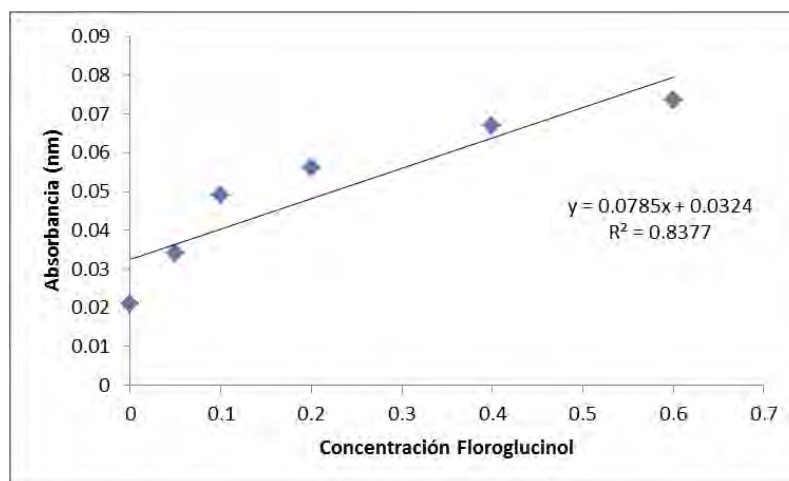
VII. Resultados

7.1. Evaluación de las concentraciones de polifenoles, flavonoides y fenoles.

Como lo establece el objetivo uno, se realizó la evaluación de los componentes secundarios mencionados en los extracto acetónico, alcohólico y acetónico, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

7.2. Cuantificación de polifenoles

A continuación se puede observar en el cuadro 5 los resultados obtenidos en los diferentes extractos y en el grafico 1 la curva de calibración con floroglucinol.



GRÁFICA 1. Curva de calibración de Floroglucinol. $R^2=0.8377$. Los resultados obtenidos se interpolaron en la curva de calibración expresándose como mg de floroglucinol / gramos de extracto.

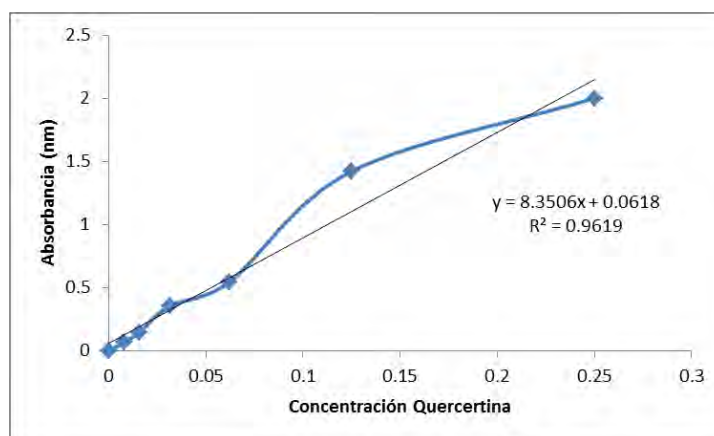
TABLA 5. Concentración de polifenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de *Cuphea procumbens*.

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

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

7.3. Cuantificación de flavonoides

En el grafico 2 se muestra la calibración con quercetina con una R^2 cercana al entero y en el cuadro 6 los resultados obtenidos en los diferentes extractos comparando hoja y flor de la planta *Cuphea procumbens*.



GRÁFICA 2. Curva de Calibración de Quercertina. $R^2=0.96$. Los valores de las muestra problema se interpolaron en la curva. El contenido total de flavonoides se estimó y expresó en mg equivalentes de quercetina/g de extracto.

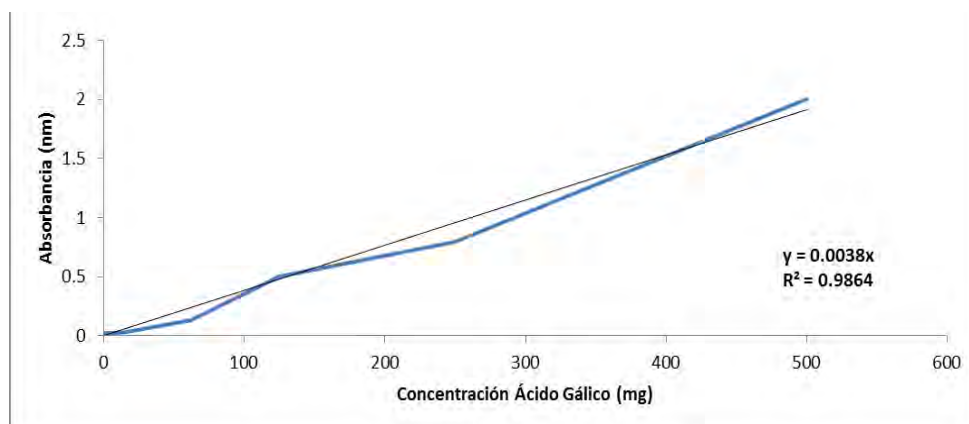
TABLA 6. Concentración de flavonoides en extractos acuoso, acetónico y alcohólico de la hierba de la calavera

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

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

7.4 Cuantificación de Fenoles

Por último se evaluó la cantidad de fenoles, para ello se utilizó de control al ácido gálico, en el grafico 3 se muestra la calibración y en el cuadro 7. Las concentraciones de fenoles obtenidos.



GRÁFICA 3. Curva de calibración del ácido gálico, $R^2=0.9864$. Los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles se interpolaron en la recta y se reportaron como mg de ácido gálico (mg GAE)/ g de extracto.

TABLA 7. Concentración de fenoles en extractos acetónico, alcohólico y acuoso de la hierba de la calavera

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

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

Una vez identificados los compuestos secundarios que presenta la planta *Cuphea procumbens*, se procedió a evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los diferentes extractos, en el cuadro 8 se muestran los controles utilizados así como los resultados obtenidos, en el grafico 4 se puede observar la cinética enzimática de los diferentes extractos en la cual el extracto acuoso de hoja y flor tiene el DPPH remanente más bajo, mostrando un porcentaje de inhibición más alto. Mientras que el acuoso de flor presenta el porcentaje más alto de DPPH remanente lo cual se traduce como un porcentaje de inhibición más débil. El cuadro 9 exhibe los resultados de los diferentes extractos.

TABLA 8. Control ácido ascórbico y gálico, para la cinética enzimática

Controles	EC50	TEC50	EA
Ac. Ascórbico	7.46 ± 2.85	3.84 ± 0.003	6.982
Ac. Gálico	6.32 ± 0.03	3.83 ± 0.004	8.263

Cinética de extractos de *Cuphea procumbens*

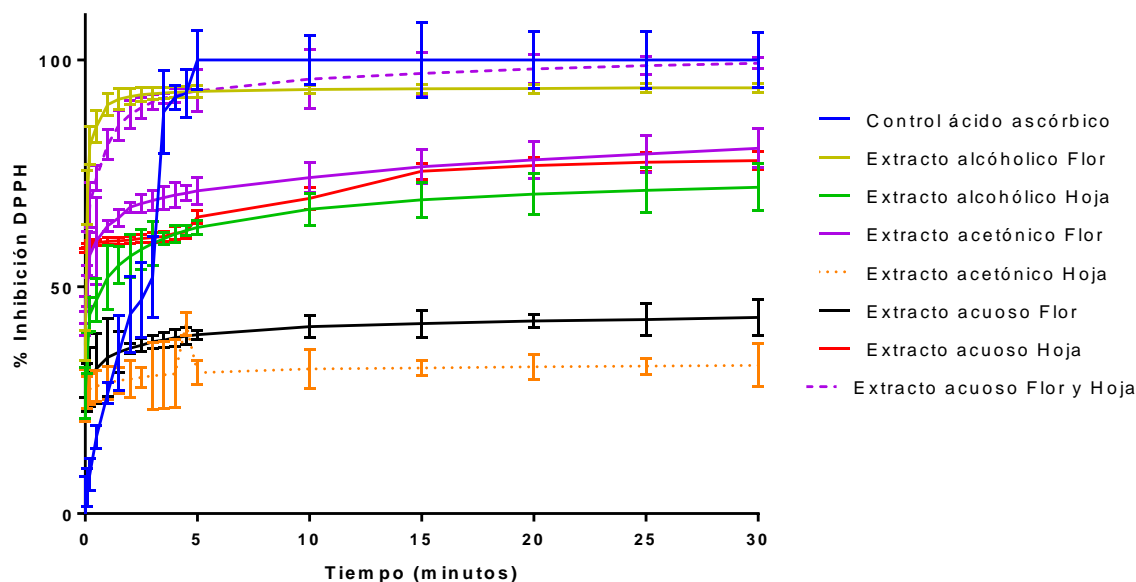


GRAFICO 4. Comportamiento cinético de los extractos, acuoso, acetónico, alcohólico de flor y hoja

TABLA 9. Resultados cinética enzimática de los extractos; acuoso, acetónico y alcohólico

Extracto	Tejido	EC50	TEC50	EA (1X10 ⁻³)
Acuoso	Hoja	11.46 ± 0.23	1.08 ± 0.05	80.01
	Flor	6.24 ± 0.05	4.2 ± 4.25	37.35
	HYF	5.4±0.19	0.1±0-05	185.151*
Acetónico	Hoja	7.37 ± 0.19	2.75± 0.76	49.19
	Flor	10.41 ± 0.65	0.133 ± 0.16	722.26*
Alcohólico	Hoja	7.79 ± 0.12	1.54 ± 1.73	83.32
	Flor	5.27 ± 0.65	0.1 ± 0.001	1897*

Se observa en los grupos una n=6. (*) muestra una diferencia significativa de p<0.001. Se observan los diferentes parámetros obtenidos en extractos de hoja y planta.

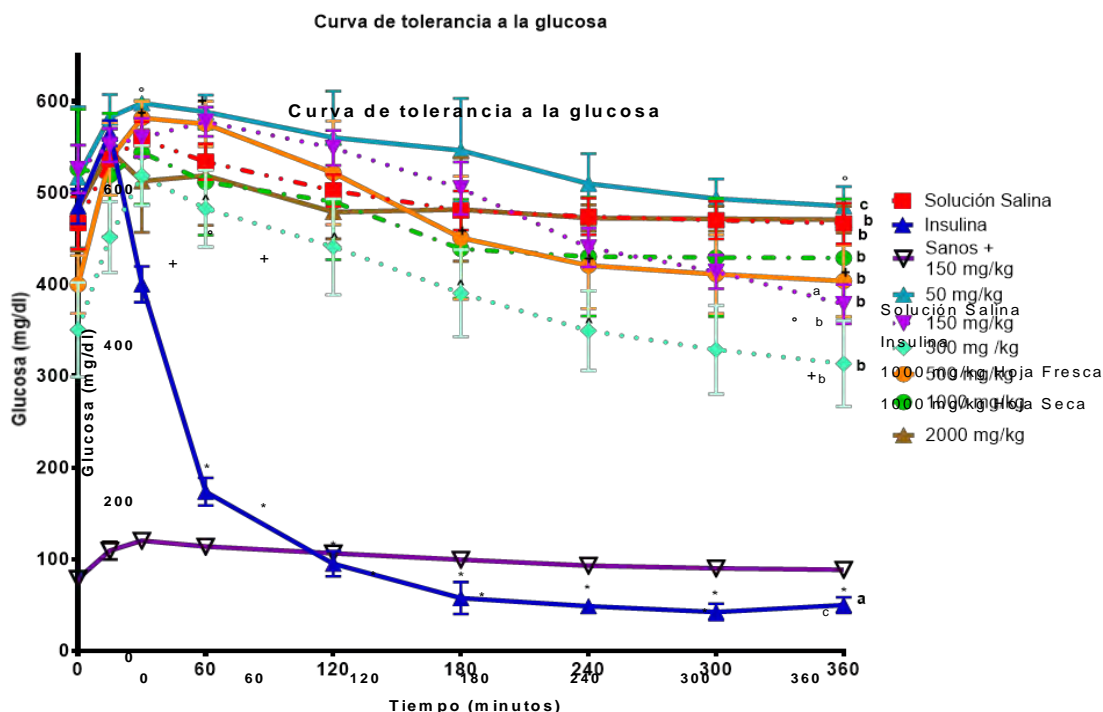
7.5. Evaluación del efecto hipoglucemiante de la planta

Para establecer la dosis con efecto hipoglucemiante se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa oral en diferentes dosis basándose en la guía de OECD 420 del 2001.

El efecto hipoglucemiante se comprobó en los modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 inducida por aloxano y diabetes mellitus tipo 2 generada por una administración crónica de fructosa

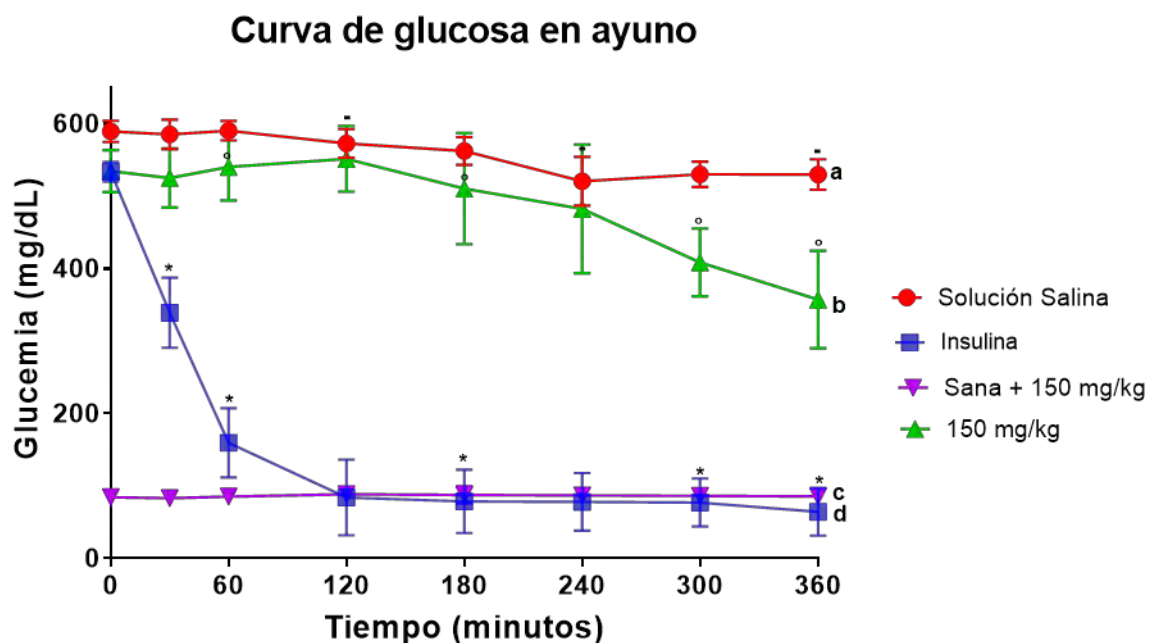
7.6. Evaluación del efecto hipoglucemiante en DM1

El gráfico 5 muestra los resultados de reducción en la glucemia inicial observados en una curva de tolerancia a la glucosa oral el extracto acuoso de la planta *Cuphea procumbens* en la cual se utilizaron como grupo control negativo a las ratas con administración de solución salina y grupo control positivo con insulina. El último grupo tuvo una disminución de la glucemia a partir del minuto 15 normalizando la glucemia en el minuto 60. El grupo control negativo no disminuyó los valores de glucemia, durante el desarrollo del ensayo se mantuvieron elevados. Al probar las diferentes dosis del extracto acuoso, la dosis de 150 mg/dL tuvo el mejor resultado en comparación con las otras dosis.



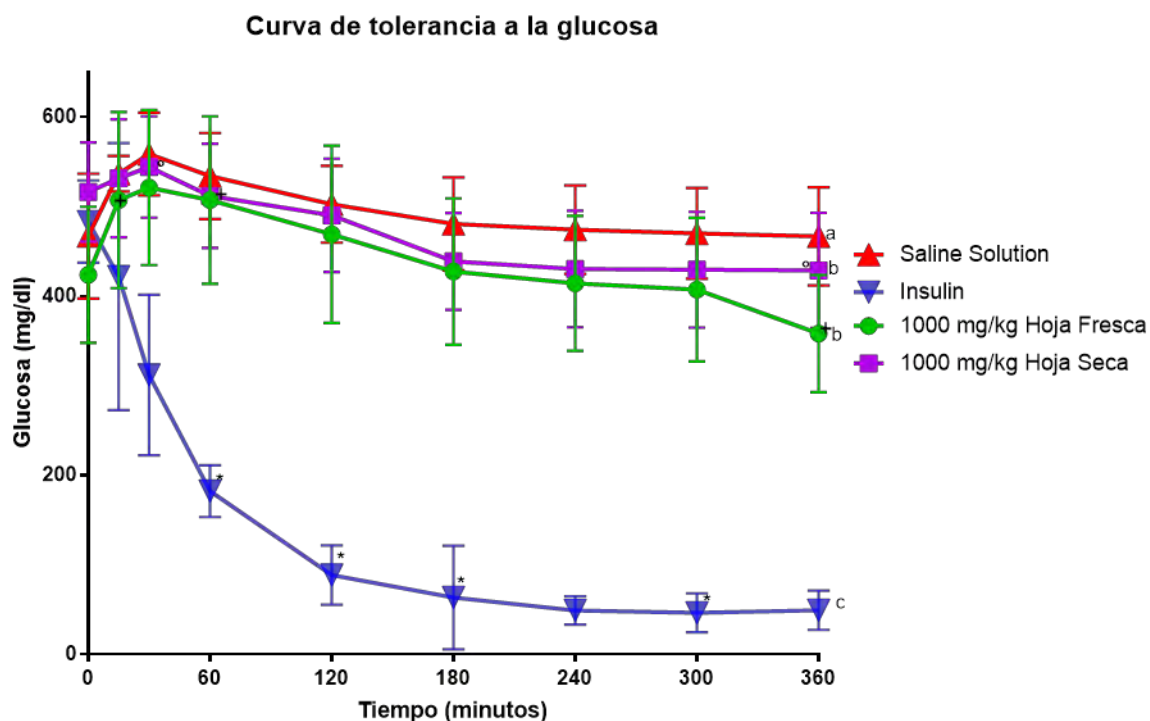
GRÁFICA 5. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acuoso de la hoja de *Cuphea procumbens* en machos con DM I. Se muestra las medias y desviación estándar de las dosis de extracto acuoso (50, 150, 300, 500, 1000, 2000 mg/kg). De una n=6 por grupo. Se analizó con ANOVA entre los grupos y un post hoc Tukey mostrando significancia $p < 0.05$. (*) Indica diferencia entre tiempos y (a, b) muestra la diferencia significativa entre grupos. El área bajo la curva del control negativo (solución salina)= 100%, control positivo (insulina)=23.32%, en las diferentes dosis: 50 mg/kg=108.5, 150 mg/kg=77.26%, 300 mg/kg=80.30%, 500 mg/kg=95.8%, 1000 mg/kg=94.04% y 2000 mg/kg=98.49%, Ratas sanas + 150 mg/kg=20.26%.

Posteriormente se probó la mejor dosis en curva de glucosa en ayuno para descartar efecto gluconeogénico a nivel hepático



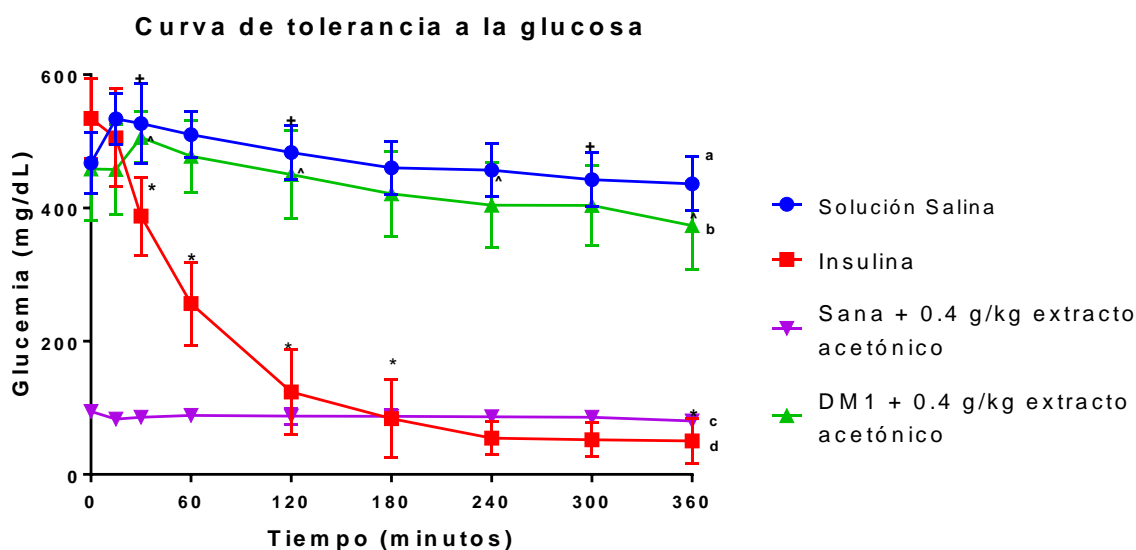
GRÁFICA 6. Curva de Glucosa en Ayuno con extracto acuoso de la hoja de *Cuphea procumbens* en machos con DM I. Se muestra las medias y desviación estándar de la dosis de extracto acuoso (150 mg/kg). De una n=6 por grupo. Se analizó con ANOVA entre los grupos y un post hoc Tukey mostrando significancia $p < 0.05$. (*) Indica diferencia entre tiempos y (a, b, c, d) muestra la diferencia significativa entre grupos. El área bajo la curva del control negativo (solución salina)= 100%, control positivo (insulina)=23.30%, en la dosis de 150 mg/kg= 87.9%, Ratas sanas + 150 mg/kg=15.58%.

Al comprobar el efecto hipoglucemiante de la planta *Cuphea procumbens* se procedió a comparar el efecto de la planta seca y fresca usando la dosis de 1000 mg/kg como se muestra en el grafico 7.



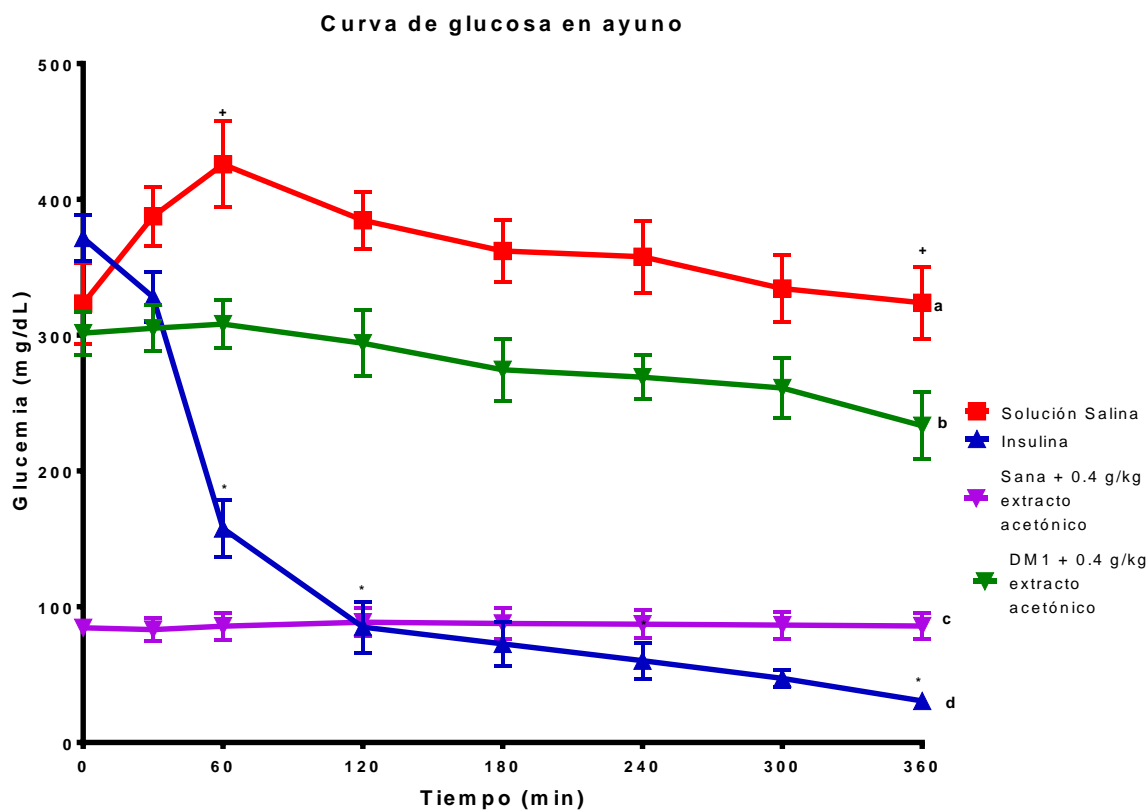
GRÁFICA 7. Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas macho con Diabetes Mellitus 1 contrastando el efecto del extracto acuoso de la hoja fresca y seca. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una $n=6$ por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (insulina) y los extractos acuosos de hoja fresca y seca en la dosis de 1000 mg/kg. Se aplicó un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p<0.001$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, insulina: 23.32%, extracto acuoso de hoja fresca: 89.5% y de extracto acuoso de hoja seca: 94.1%.

Una vez corroborada la dosis óptima se procedió a evaluar el efecto en el extracto acetónico y alcohólico como se muestra en los gráficos 8, 9, 10 y 11.



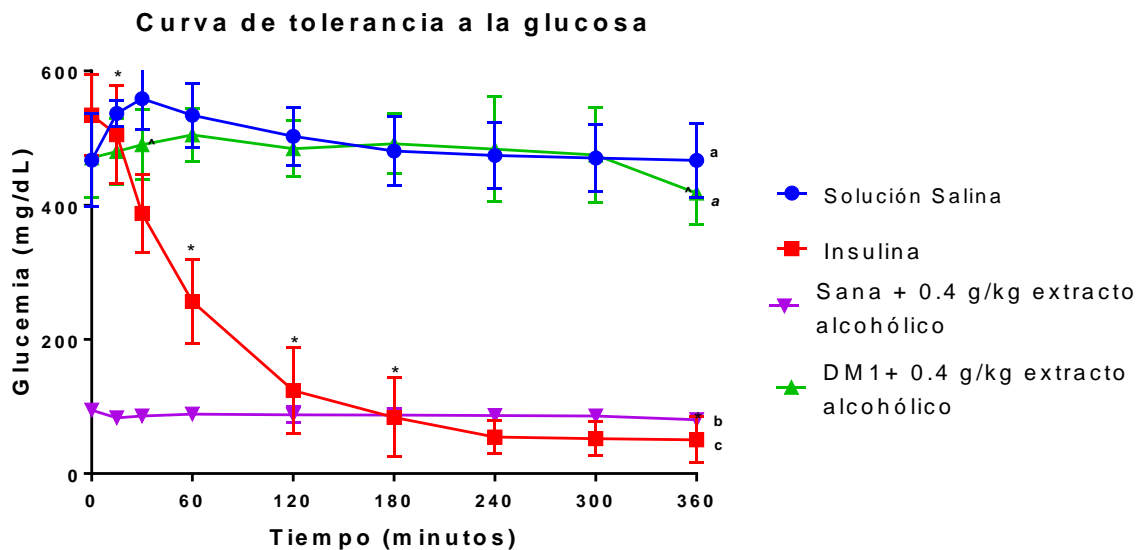
GRÁFICA 8. Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas macho con Diabetes Mellitus 1 mostrando el efecto del extracto acetónico. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una $n=6$ por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (insulina) y el extracto acetónico de hoja en la dosis de 0.4 g/kg. Se muestran las diferencias significativas entre tiempo (*), (a,b,c) indican diferencias entre los diferentes grupos al aplicar un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p<0.001$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, insulina: 25.3%, Ratas sanas + extracto acetónico: 13%, DM1 más extracto acetónico de hoja: 90.7%.

Se muestra a continuación los resultados obtenidos en la curva de glucosa en ayuno utilizando el extracto acetónico en la misma dosis (0.4 g/kg). Donde se aprecia la diferencia significativa entre los controles y el extracto de *Cuphea procumbens*.



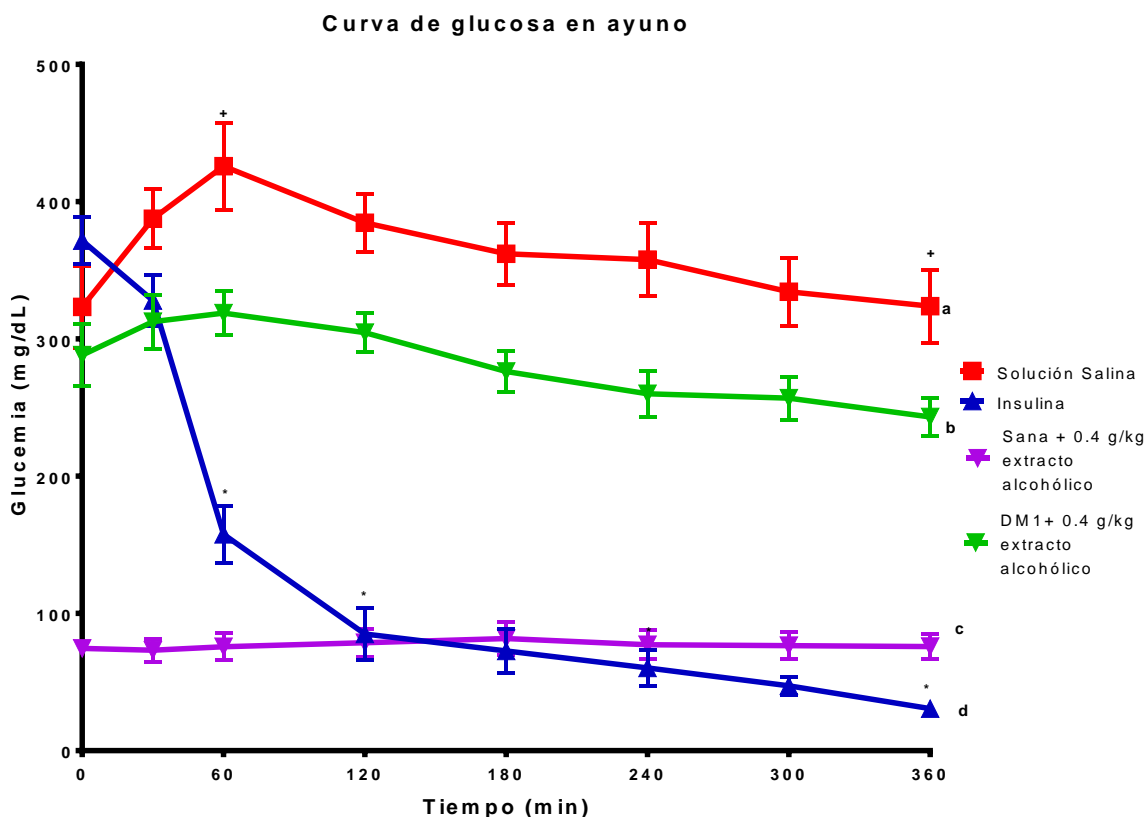
GRÁFICA 9. Curva de Glucosa en ayuno en ratas macho con Diabetes Mellitus 1 mostrando el efecto del extracto acetónico. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una n=6 por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (insulina), grupo sanos y DM1 más el extracto acetónico de hoja en la dosis de 0.4 g/kg. Se muestran las diferencias significativas entre tiempo (*), (a,b,c) indican diferencias entre los diferentes grupos al aplicar un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p < 0.0001$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, insulina: 83%, grupo sanos: 12.8% y DM1 más extracto acetónico de hoja: 78.35%.

En la gráfica 10 se observan los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa en el extracto alcohólico de la planta *Cuphea procumbens*, observándose que no se presentó diferencia significativa entre el control negativo y el extracto de la planta.



GRÁFICA 10. Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas macho con Diabetes Mellitus 1 mostrando el efecto del extracto alcohólico. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una n=6 por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (insulina) y el extracto acetónico de hoja en la dosis de 0.4 g/kg. (*) Muestra las diferencias significativas entre tiempo, (a,b,c y d) indican diferencias entre los diferentes grupos. Se aplicó un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p < 0.001$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, insulina: 29.3%, grupo sanos: 14.98% y DM1 más extracto alcohólico de hoja: 97.3%.

El siguiente grafico 11 muestra los resultados obtenidos con la curva de glucosa en ayuno utilizando el control positivo (insulina), control negativo (solución salina) y el extracto alcohólico de la planta *Cuphea procumbens* en una dosis de 0.4g/kg de extracto.



GRÁFICA 11. Curva de Glucosa en ayuno en ratas macho con Diabetes Mellitus 1 mostrando el efecto del extracto alcohólico. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una n=6 por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (insulina) y el extracto acetónico de hoja en la dosis de 0.4 g/kg. Se muestran las diferencias significativas entre tiempo (*), (a,b,c y d) indican diferencias entre los diferentes grupos al aplicar un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p < 0.0001$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, insulina: 83%, sana: 87.97% y DM1 más extracto alcohólico de hoja: 76.85%.

En forma de epitome de los efectos observados en los extractos acuoso, acetónico y alcohólico utilizados, se crea el cuadro 5 donde se expresan en porcentajes el efecto hipoglucemiante mostrados en las curvas de tolerancia a la glucosa oral y curva de glucosa en ayuno. Se observa de los extractos utilizados de *Cuphea procumbens*, una mayor

porcentaje de disminución en el extracto acuoso durante la curva de glucosa en ayuno (33.1%), así como también en la curva de tolerancia a la glucosa oral (28%).

TABLA 11. Porcentaje del efecto hipoglucemiante en los diferentes extractos de *Cuphea procumbens* en DM1.

Porcentaje de Reducción de la Glucemia Inicial				
Tejido	Extracto	Dosis empleada	Curva de tolerancia a la glucosa	Curva de glucosa en ayuno
HOJA	Extracto acuoso	150 mg/kg	28%	33.1%
	Extracto acetónico	0.4 g/kg	18.4%	22.59%
	Extracto alcohólico	0.4 g/kg	11.1%	6.4%
	Insulina	100 mg/kg *	89.8%	87.9%

De igual forma con las ratas alimentadas con fructosa vía oral se examinó la dosis óptima para generar el efecto hipoglucemiante a través de la curva de tolerancia a la glucosa, utilizando las mismas concentraciones de extracto acuoso como se observa en el gráfico 5.

7.7. Evaluación del efecto hipoglucemiante en DM2

De igual forma que en el modelo de diabetes mellitus 1 se utilizaron los extractos acetónico, alcohólico y acuoso de la planta *Cuphea procumbens*, sin embargo en el modelo de diabetes mellitus 2 se establecieron dosis más bajas adecuándolas a los niveles de glucemia iniciales. Como se observa en el gráfico 12.

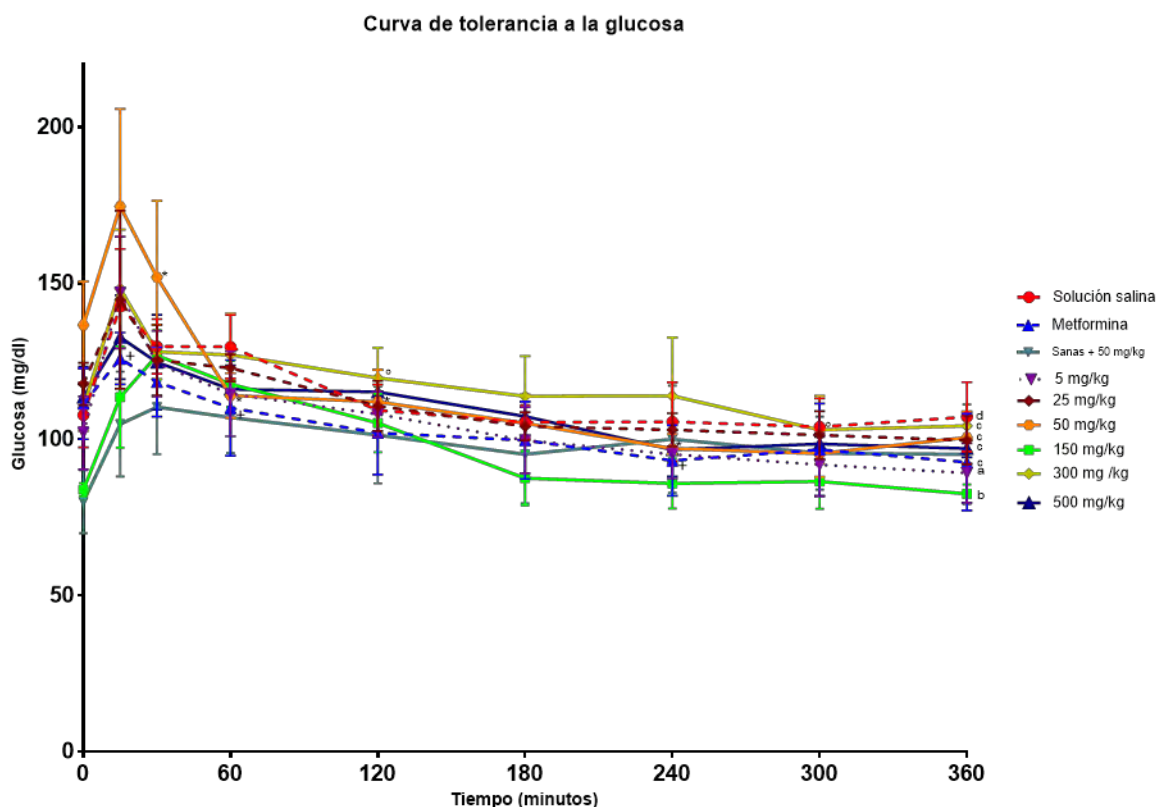
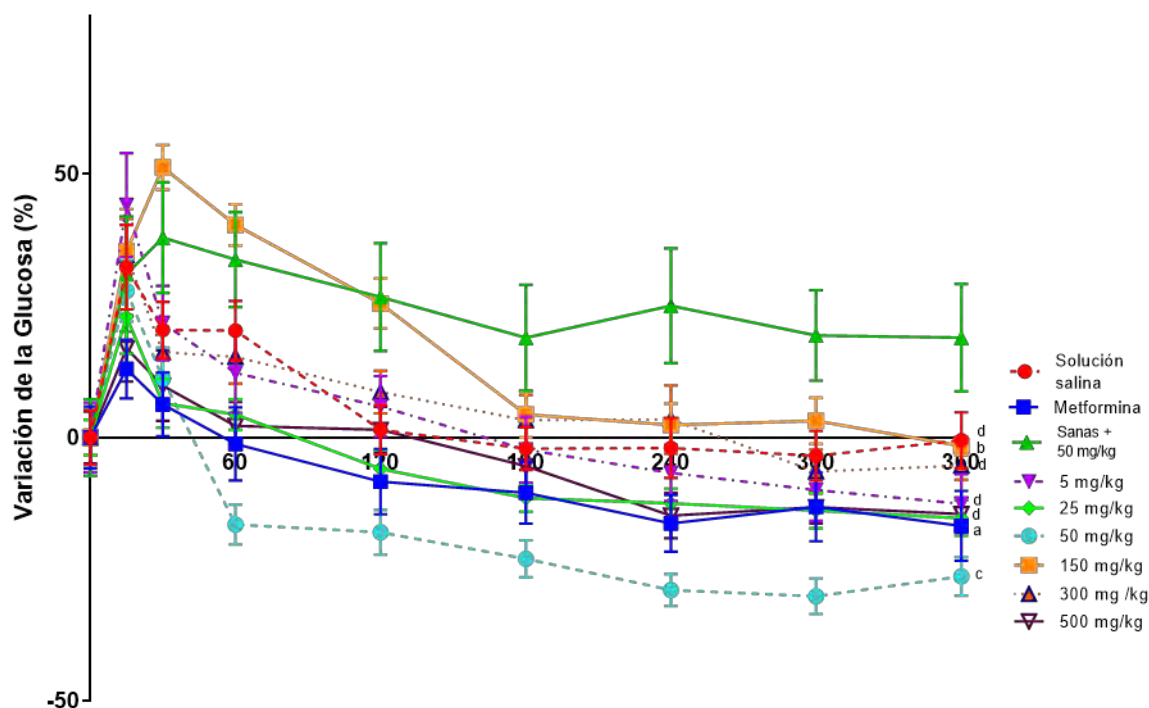


GRAFICO 12. Curva de Tolerancia a la Glucosa con diferentes dosis del extracto acuoso de la hoja en el modelo de Diabetes Mellitus tipo 2. n=6 por grupo, de los cuales se observa media y desviación estándar, se utilizaron como grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (metformina) y a los grupos de administración del extracto acuoso de la hoja en sus diferentes dosis. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un post hoc de Tukey, el cual mostro diferencias grupales (a, b, c y d) ($p < 0.0001$). Se calculó el área bajo la curva resultando: solución salina: 100%, metformina: 90.6%, 5mg/kg: 92.3%, 25 mg/kg: 97.9%, 50 mg/kg: 98.5%, 150 mg/kg: 86.3%, 300 mg/kg: 103.5%, 500 mg/kg: 88.79% y en ratas sanas + 50 mg/kg: 88.79%.

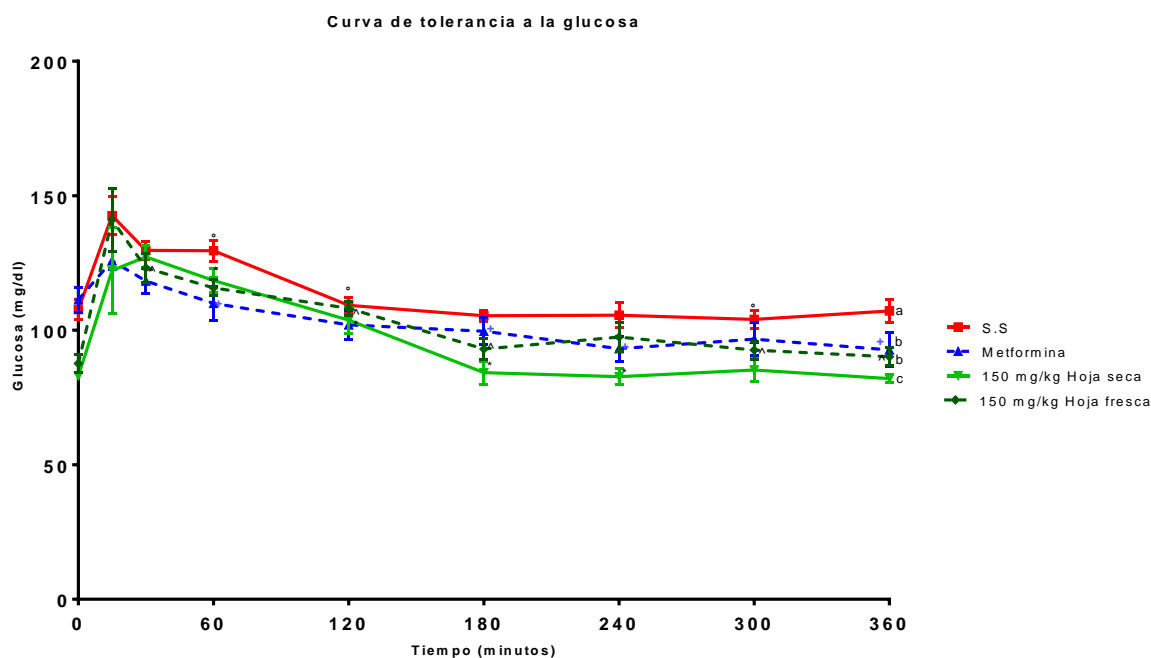
Para observar con mayor claridad el efecto hipoglucemiante de las dosis utilizadas en el modelo de Diabetes Mellitus 2, se calculó el porcentaje de variación de la glucosa como se muestra en el gráfico 13.



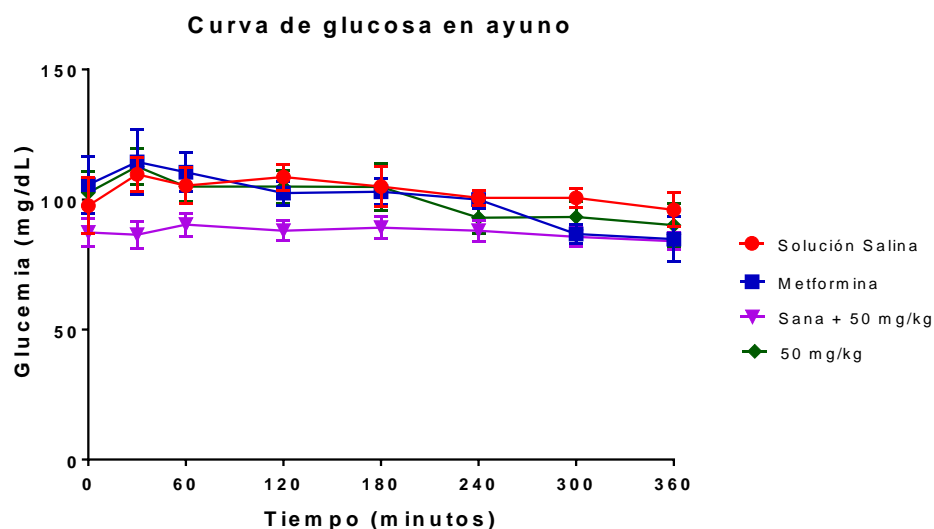
GRÁFICA 13. Porcentaje de Variación de glucosa en ratas macho con Diabetes Mellitus 2.

n=6 por grupo, de los cuales se representan los valores con media y desviación estándar, se observan como grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (metformina) y a los grupos de administración del extracto acuoso de la hoja en sus diferentes dosis.

Una vez establecida la dosis óptima del efecto hipoglucemiante, se comparó el efecto de la hoja seca y fresca de *Cuphea procumbens* en la dosis de 150 mg/kg (gráfico 14). Entre los grupos analizados no se reporta diferencia significativa, sin embargo al minuto 60 los dos grupos mostraron el inicio de la reducción de la glucemia.



GRÁFICA 14. Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas con Diabetes Mellitus 2 contrastando el efecto del extracto acuoso de la hoja fresca y seca. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una n=6 por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (metformina) y los extractos acuosos de hoja fresca y seca en la dosis de 150 mg/kg. Se aplicó un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p < 0.05$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, metformina: 90.6%, extracto acuoso de hoja fresca: 85.2% y de extracto acuoso de hoja seca: 91.4%.



GRÁFICA 15. Curva de Glucosa en Ayuno con extracto acuoso de la hoja de *Cuphea procumbens* en machos con DM 2. Se muestran la media y la desviación estándar de los grupos, donde se utilizó una n=6 por grupo. Se presentan el grupo control negativo (solución salina), grupo control positivo (metformina), sana más extracto acuoso (50 mg/kg), grupo diabetes mellitus 2 más extracto acuoso (50 mg/kg). Se aplicó un análisis ANOVA ajustando con post-hoc Tukey ($p < 0.005$). El área bajo la curva calculada fue; solución salina: 100%, metformina: 96.7%, extracto acuoso de hoja fresca: 84.6% y de extracto acuoso de hoja seca: 96.9%.

TABLA 12. Porcentaje del efecto hipoglucemiante en los diferentes extractos de *Cuphea procumbens* en DM2

Tejido	Extracto	Porcentaje de Reducción de la Glucemia Inicial				
		Dosis empleada	Curva de tolerancia a la glucosa	Tiempo de reducción	Curva de glucosa en ayuno	Tiempo de reducción
HOJA	E. Acuoso	50 mg/kg	26.3%	180	21.1%	120
	E. acetónico	0.4 g/kg	11.9 %	120	18.2 %	120
	E. alcohólico	0.4 g/kg	15.2 %	120	11.6 %	180
	Metformina	6 UI/kg	16.7%	120	18.5%	60

7.8. Efectos de la *Cuphea procumbens* en la administración crónica

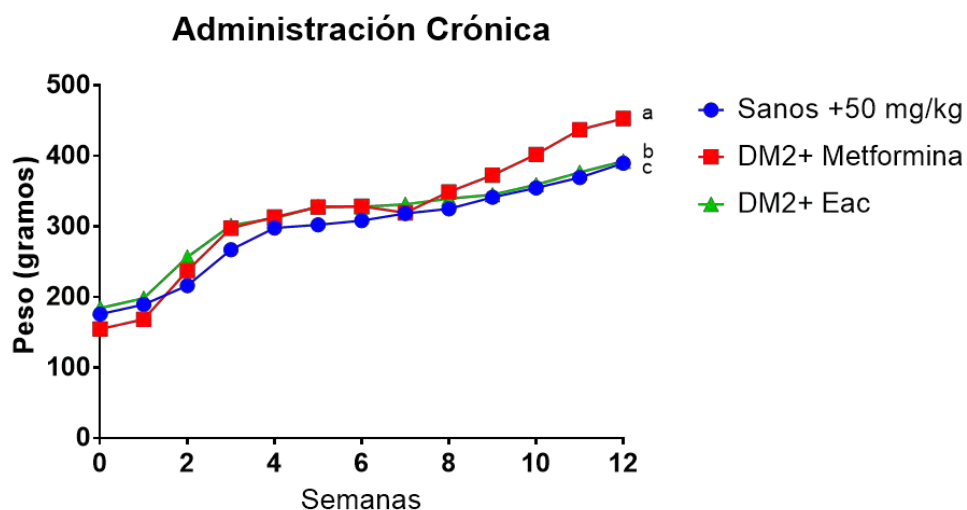
Los resultados de los parámetros medidos cada semana durante la administración crónica se muestran a continuación.

7.8.1. Peso de los animales durante la administración.

Uno de los parámetros medidos semanalmente fue el peso de los animales en experimentación durante 12 semanas. En la cuadro 13 se muestra los promedios con desviación estándar expresado en gramos, los resultados muestran un incremento del peso en todos los grupos, los cuales se graficados se pueden ver en la gráfica 16.

TABLA 13. Peso de los animales durante la administración crónica.

	Semana												
	Inicio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sanos + 50 mg/kg	175.6± 4.2	189.12± 8.5	215.96± 8.2	266.87±9.2	297.75±9.1	302.3±6.1	308.1±5.5	318.3±5.3	324.78±4.3	341.25±5.8	354.71±5.1	369.28±4.3	389.5±6.8
DM2+ Metformina	154.33±4.4	168.21±3.2	237.22±5.8	297.6±6.5	313.4±6.4	327.4±4.6	328.5±7.2	319.14±7.	348.9±6.2	372.8±5.3	402±6.2	436.98±4.2	453±5.4
DM2+ Eac	184.22±4.2	198.3±5.6	256.47±6.1	301.5±6.4	311.5±6.3	328.14±5.4	327.8±5.1	331.3±4.5	339.36±3.6	345±4.4	359.24±5.2	376.51±4.8	392.35±6.2



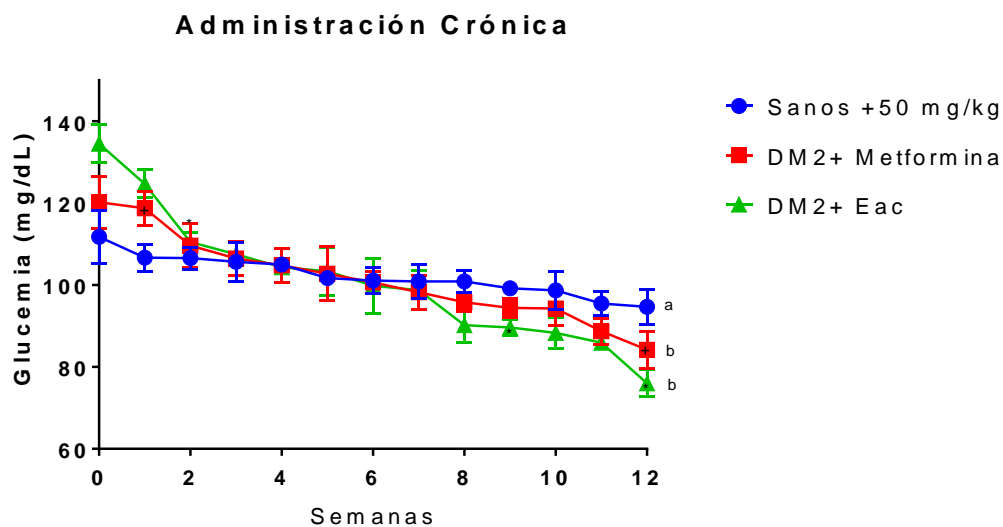
GRÁFICA 16. Peso de los animales durante la administración crónica. Los resultados muestran los promedios y desviación estándar de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6). (a,b y c) indican diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey, con una $p < 0.0001$.

7.8.2. Niveles de glucemia durante la administración crónica

En el cuadro 14 se muestran las concentraciones de glucosa circulante durante la administración crónica, los niveles de glucemia de los grupos disminuyeron a valores normales en la semana 12. El grupo de DM2 más extracto acuoso tuvo la mayor reducción de la glucemia normalizando sus valores a partir de la semana 8. En la gráfica 17 se pueden apreciar las disminuciones de los grupos experimentales.

TABLA 14. Glucemia de los animales durante la administración crónica.

	Semana												
	Inicio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sanos + 50 mg/kg	111.75±6.5	106.7±3.2	106.7±2.7	105.66±4.8	105.01±1.3	101.69±1.2	101.15±3.1	100.94±4.1	101.89±2.7	99.2±1.3	98.7±4.6	95.5±2.8	94.67±4.2
DM2+ Metformina	120.20±6.3	118.74±4.2	109.64±5.3	106.5±4.2	106.78±4.1	100.62±2.7	98.25±4.9	95.78±2.1	94.42±5.8	94.42±5.8	88.71±3.1	84.2±4.5	84.66±1.8
DM2+ Eac	134.53±4.6	124.7±3.4	110.5±2.4	107.5±1.7	104.33±1.3	103.37±5.8	99.83±6.7	98.75±4.7	90.20±1.2	89.68±2	85.93±1.3	75.63±3.2	75.99±4.9



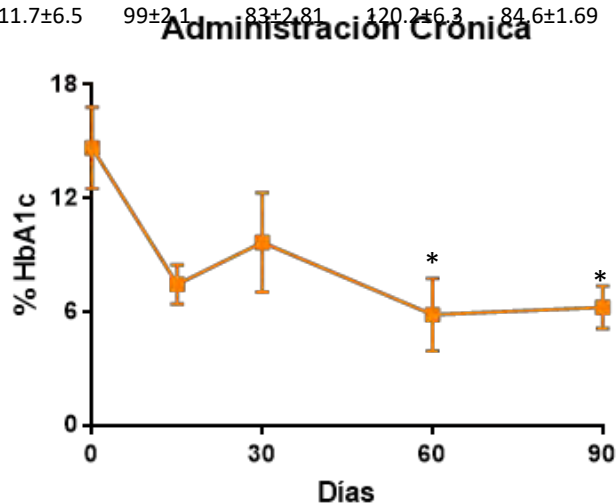
GRÁFICA 17. Glucemia de los animales en el periodo de administración crónica. Los resultados muestran los promedios y desviación estándar de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6). (a y b) indican diferencia significativa entre los diferentes grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un ajuste post hoc de Tukey, con una $p < 0.005$.

7.8.3. Prueba de orina en la administración crónica

En el cuadro 15. Se observan los valores de orina resultantes en el tiempo 0 o inicio de la administración (T₀) y al finalizar (T₉₀), se aprecia una disminución en la excreción de proteínas y glucosa en las ratas con DM2 administradas con el extracto acuoso. En el grupo tratado con metformina se puede observar de igual manera un control en la excreción de proteínas y glucosa.

TABLA 15. Prueba de orina en ratas con DM2 en administración crónica

Prueba de orina en ratas							
Parámetros	Sanas+ Extracto Acuoso		Control DM2	DM2+Metformina		DM2+Extracto acuoso	
	T ₀	T ₉₀	T ₀	T ₀	T ₉₀	T ₀	T ₉₀
Sedimentación	1.030	1.015	1.025	1.025	1	1.020	1.010
pH	7	7	8	8	8	8	8
Leucocitos	++	++	+	++	++	+	-
Nitrógeno	+	Negativo	Negativo	+	Negativo	+	+
Proteínas	++	++	++	+++	++	++	+
Glucosa	+	Negativo	Negativo	+	Negativo	+++	Negativo
Cuerpos Cetónicos	+	+	++	+	+	++	Negativo
Urobilinogeno	+	Negativo	Negativo	+	Negativo	++	Negativo
Billirubinas	Negativo	Negativo	-	++	Negativo	++	Negativo
Eritrocitos	Negativo	Negativo	++++	+	+	Negativo	Negativo
Hb en orina	+++	+	++++	+	++	++++	Negativo
HbA1c	5%	4.5%	Negativo	>8%	4.1%	>8%	4%
	111.7±6.5	99±2.1	83±2.81	120.2±6.3	84.6±1.69	134.5±4.6	75.99±4.9



GRÁFICA 18. Hemoglobina glicosilada de los animales en el periodo de administración crónica. Los resultados muestran los promedios y desviación estándar de cada grupo de un total de 6 animales por cada grupo (n=6). (*) Muestra una diferencia significativa en los tiempos.

VIII. Discusión

Por primera vez se reportan los efectos hipoglucemiantes y antioxidantes *In vitro* de la planta *Cuphea procumbens*. La administración de la planta medicinal se realizó por la mañana (9-10), basados en reportes la medicina tradicional donde a los pacientes se recomienda su consumo en las primeras horas de la mañana (Sudasunghé y Peiris, 2018).

Se utilizaron modelos de diabetes experimental en ratas utilizando sustancias que afectan el funcionamiento adecuado de la célula beta pancreática (aloxano y fructosa), los cuales son modelos muy convenientes y de fácil utilización (Moradabadi *et al.* 2013).

Los resultados muestran que los efectos hipoglucemiantes producidos por los diferentes extractos no fueron dosis-dependientes. Particularmente el efecto hipoglucemiante por las dosis altas fue menor comparado con las dosis bajas para diabetes tipo 1 (150 mg/kg) y diabetes tipo 2 (50 mg/kg). La reducción de la glucemia puede deberse a una interacción acumulativa de los componentes fitoquímicos de los extractos. Es posible que las dosis altas muestren una acción dual de la activación e inhibición de la glucosa en sangre. Sudasunghé y Peiris, 2018 plantean la hipótesis sobre la presencia de moléculas antagonistas en los extractos de la planta con la posible capacidad de disminuir la actividad del extracto hipoglucemiante del extracto. Tal vez debido a ello las dosis más bajas contienen menos concentración de antagonistas permitiendo que se observe el efecto hipoglucemiante de la planta. Lo anterior se comprueba al comparar el efecto del extracto acuoso con sus diferentes dosis.

La forma de control de la glucemia por parte del extracto acuoso de la planta se puede deber a la presencia de compuestos como polifenoles, flavonoides y fenoles, los cuales podrían favorecer una reducción de la hiperglucemia al inhibir la α -amilasa y α -glucosidasa. Así como inhibir la absorción de la glucosa intestinal, generando un incremento de la secreción de insulina y protección a la célula beta pancreática (Hanhieva *et al.* 2010).

Un posible mecanismo mediante el cual los polifenoles favorecen la sensibilización de los tejidos periféricos y mejorar la captación de glucosa es mediante el aumento de la fosforilación de AMPK y activando PI3K (Hanhieva *et al.* 2010).

El mecanismo es el siguiente: al activar el PI3K o Akt, las señales se transmiten intracelularmente a vesículas que contienen GLUT4 lo que lleva a su translocación, anclaje y fusión del GLUT4 con la membrana plasmática (Yamashita *et al.* 2016).

Al activar el AMPK esta molécula puede ejercer una función protectora de la célula beta contra la glucolipototoxicidad (Kim *et al.* 2016), debido que al activarse la AMPK puede inhibir la oxidación de la glucosa mitocondrial y la síntesis de ATP en la célula beta, con lo que activa canales de potasio disminuyendo el flujo del calcio estimulado por glucosa lo que conduce a la fosforilación de kinesina, miosina y syntaxina, afectando el tráfico de las vesículas que almacenan la insulina y permitiendo su liberación (Rutter *et al.* 2003).

Las curva de tolerancia a la glucosa permitió comprobar el control de la glucosa postprandial ejercida por el extracto, lo anterior puede deberse a una regulación de la captación de glucosa intestinal a través de la inhibición de la absorción y digestión de los carbohidratos (Moradabadi *et al.* 2013).

Otro mecanismo probable del control de la glucemia es la capacidad de los polifenoles de incrementar la vida media de GLP-1, molécula con la capacidad de estimular a la célula beta para producir insulina, una vez liberada la insulina genera la sensibilización en tejidos periféricos (musculo y tejido adiposo), lo que restaura los niveles de la glucemia (Domínguez-Ávila *et al.* 2017)

Al comparar la reducción de la glucemia en los diferentes extractos, se puede observar que el acuoso genero una mayor reducción, con lo que se deduce la actividad de los compuestos de la planta los cuales ocasiona una mejor respuesta de la glucemia debido a que al no tratar a la planta con algún disolvente los compuestos se encuentran en su forma completa. Sin embargo, el extracto acetónico al compararlo con el alcohólico mostro una mayor reducción, debido a que en la obtención de los extractos acetónico se

aíslan compuestos como los flavonoides, además de que se puede contener grupos de aldehído y condensación de aldol u otros como carotenos y xantofilas (Delgado-Vargas *et al.* 2000).

Los resultados exhiben un patrón de actividad decreciente de la glucemia desde el minuto 180 en la diabetes DM1 y en DM2. Lo anterior puede suceder ya que los componentes del extracto necesitan una fase de latencia para alcanzar la concentración a la que son efectivas. Otros estudios con plantas medicinales reportan un tiempo de 2 a 5 h para ver la actividad hipoglucemiante de la planta (Wanniarachchi *et al.* 2009; Sudasunnghe y Peiris, 2018).

Otra propiedad descrita para los compuestos identificados en la planta *Cuphea procumbens* como los flavonoides y los compuestos fenólicos, pueden reducir el potencial antidiabético a través de una actividad insulino-mimética del extracto de la planta (Patel *et al.* 2012).

La confirmación de flavonoides, fenoles y polifenoles en la planta *Cuphea procumbens*, sugiere que estos compuestos (Hanhineva *et al.* 2010) son los que confieren la propiedad hipoglucemiante de la planta. Existe la posibilidad que los compuestos secundarios de la planta puedan inhibir el transporte a través de la membrana intestinal por un tipo de inhibición no –competitivo con el transportador de glucosa GLUT1 y SGLT1 (Sudasunnghe y Peiris, 2018; Nistor-Bladea *et al.* 2010). Reduciendo los valores de la glucemia circulantes.

En el tratamiento a largo plazo (90 días) el extracto acuoso de la planta normalizo los valores de forma similar a la metformina a partir de la semana 4. Durante la administración crónica no se observaron signos toxicológicos de la planta *Cuphea procumbens*, constatado mediante el aumento de peso en los 3 meses de la prueba. El grupo con un mayor incremento fue el grupo tratado con metformina, lo cual puede deberse al consumo de Fructosa en la alimentación de la rata, sin embargo los valores de HbA1c mostraron un rango normal al final el periodo de experimentación.

En cuanto a la glucemia durante la administración crónica, la reducción con el extracto acuoso fue de casi un 52% normalizando los valores de la glucemia desde la semana 4. Al medir el control metabólico mediante la cuantificación de HbA1c, se observó que los valores eran menores a 6.5%, lo que se traduce en un excelente control. Para explicar este fenómeno recordemos que la hiperglucemia favorece que la glucosa participe en reacciones no enzimáticas con proteínas (reacción Maillard) como con la hemoglobina que es susceptible a este proceso de glicación (Rajamani *et al.* 2005). Para formar lo que se conoce como hemoglobina glicosilada. Por lo que al disminuir la absorción de la glucosa del lumen intestinal, se restringe la presencia de la glucosa en la periferia ante lo cual no se producen las reacciones que generan la HbA1c y la fructosamina.

En cuanto a los valores en orina de la rata, al inicio del periodo experimental mostraban un deterioro del organismo del animal, al finalizar la administración crónica se observó una normalización en valores con la disminución de la excreción de glucosa y proteína. El aumento de la glucosa en orina al inicio del periodo experimental se debió a que la glucemia de las ratas sobrepasó el umbral renal de glucosa, por lo que al filtrarse la glucosa se generó la glucosuria. Es importante recalcar que cuando la glucosa en ayuno aumenta, los niveles de glucemia en orina se mantienen altos (Yin *et al.* 2017). Por lo que el control de la hiperglucemia de la planta mediante los compuestos secundarios (polifenoles, flavonoides, fenoles) favoreció que las células epiteliales del túbulo proximal no alcanzaran la reabsorción de glucosa (umbral renal para la glucosa), lo cual se observó con la disminución de la presencia de glucosa en orina en el día 90 de la administración crónica. Un mecanismo propuesto para explicar la reducción de la proteinuria es mediante la propiedad descrita de los antioxidantes donde estos disminuyen el ARNm y la expresión de NF- κ B así como también de las citocinas inflamatorias en podocitos.

Recordemos que uno de los componentes que desencadena un rol importante en la enfermedad renal es el NF- κ B, debido a que su sobreproducción desencadena el daño renal, favoreciendo la expresión de moléculas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β y la IL-6 (Sutariya y Saraf, 2018). La presencia de nitritos en la orina de la rata coincide con lo reportado en animales con diabetes, los reportes muestran una elevada producción de óxido nítrico, componente que puede favorecer la formación del radical libre peroxinitrito, el peroxinitrito presenta la capacidad de generar nitración y oxidación de proteínas alterando su adecuada función (De Young *et al.* 2004). En otro estudio se describió en animales a los cuales se les indujo la diabetes mediante estreptozotocina, una excreción elevada de nitritos y nitratos a partir de la semana 6, lo cual sugiere un aumento de óxido nítrico, la alta concentración de esta molécula se asocia con la hiperfiltración glomerular así como a una disminución de la expresión de GLUT4 en las células glomerulares y de la vasculatura renal (Maree *et al.* 1996). Lo anterior puede explicar la presencia de nitritos al finalizar la administración crónica donde se ve reducida la cantidad pero aún existe presencia en las ratas utilizadas.

Para conocer la capacidad antioxidante de la planta *Cuphea procumbens* se analizó el efecto antioxidante *In vitro*. Podemos observar en los resultados como el extracto, alcohólico y acuoso son los que presentan una capacidad antioxidante elevada de acuerdo a la clasificación propuesta por Sanchez-Moreno *et al.* 1998. El extracto acetónico presentó la mayor capacidad antioxidante, debido a que cuando se realiza la extracción, se obtienen compuestos como flavonoides, además de que se puede determinar la presencia de grupos de aldehído y condensación de aldol, así como obtener carotenos y xantofilas (Delgado-Vargas *et al.* 2000), se ha descrito que la acetona es el mejor solvente para obtener flavonoides por su propiedad como solvente aprótico que no proporciona iones OH, al contrario del metanol el cual es un disolvente prótico polar que proporciona iones OH por lo que facilita su interacción con grupos funcionales polares como los taninos (Bakari *et al.* 2017). Lo anterior demuestra la eficacia de la acetona para extraer

antioxidantes, mientras que el metanol es efectivo en extraer compuestos fenólicos (Altemimi *et al.* 2017).

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

Con lo anterior, junto con lo observado en los parámetros de la orina y en la hemoglobina glucosidala, se puede observar que la planta *Cuphea procumbens* contiene mayor cantidad que otras plantas de la misma familia, con ello se puede deducir que su capacidad antioxidantes es mayor.

En el presente trabajo se demostró que la hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*) utilizada en la población de Michoacán si tiene actividad hipoglucemiante y antioxidante en animales experimentales, lo que proporciona el primer reporte a nivel mundial que apoya el uso que la población utiliza como tratamiento de la diabetes.

IX. Conclusiones

- La planta *Cuphea procumbens* ejerce un efecto hipoglucemiante en ratas con DM1 y DM2
- Los extractos acetónico, alcohólico y acuoso presentan metabolitos con propiedades descritas como antioxidantes e hipoglucemiantes
- Los extractos de la planta muestran capacidad antioxidante *In vitro*.
- La administración crónica del extracto acuoso de la planta ejerce un control metabólico en la DM2
- El extracto acuoso de *Cuphea procumbens* en administración crónica normaliza la glucemia.

X. Perspectivas

- Evaluar el efecto antioxidante *in vivo* utilizando la planta *Cuphea procumbens* en un modelo de animales con diabetes tipo 1 y 2.
- Identificar los compuestos responsables del efecto antioxidante e hipoglucemiante.
- Evaluar la combinación del extracto junto con fármacos utilizados comúnmente en México para pacientes con diabetes mellitus tipo I y II.

XI. Referencias

1. Acalbert, A. and Williamson, G. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of nutrition*, (130)8: 20735-20855.
2. American Diabetes Association. 2010. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. 33(1):62-69.
3. Alegre-Díaz J, Herrington W, López-Cervantes M, Gnatiuc L, Ramirez R, Hill M, Baigent C, McCarthy I, Lewington S, Collins R, Whitlock G, Tapia-Conyer R, Peto R, Kuri-Morales P y Emberson J. 2016. Diabetes and Cause-Specific Mortality in Mexico City. *The new england journal of medicine*. 375(20):1961-1971.
4. Altagracia-Martínez, M., Kravzov-Jinich, J., Moreno-Santamaría, M. d. R. and Rubio. 2007. Diabetes mellitus tipo 2: ventas de los hipoglucemiantes orales y costos de los tratamientos farmacológicos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 38(1): 23-33.
5. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson D y Lightfoot D. 2017. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 6(42):1-23.
6. Angelino D, Cossu M, Marti A, Zanolettic M, Chiavaroli L, Brighenti F, Del Rio D, Martini D. 2017. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. *Food Functional*. 22:1-52.
7. Arizaga, S. 2007. *Estudio y Colección Viva de Plantas Medicinales Nativas y Formación de un Banco de Germoplasma del Estado de Michoacán, Morelia: UNAM-Campus Morelia*.
8. Attanayake AP, Jayatilaka KA, Pathirana C, Mudduwa LK. 2013. Study of antihyperglycaemic activity of medicinal plant extracts in alloxan induced diabetic rats. *Ancient Science of Life*. 32(4):193-198.

9. Avello M y Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 2:161-172.
10. Avello, M. and Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* , 494(2): 161-172.
11. Bahadoran Z, Mirmiran P y Azizi F. 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 12:43-
12. Bakari S, Dadud A, Felhi S, Smaoui S, Gharsallah N y Kadri, A. 2017. Proximate analysis, mineral composition, phytochemical contents, antioxidant and antimicrobial activities and GC-MS investigation of various solvent extracts of cactus cladode. *Food Science and Technology*. 37(2): 286-293.
13. Barquera S, Campos-Nonato I, Aguilar-Salinas C, Lopez-Ridaura R, Arredondo A y Rivera-Dommarco J. 2013. Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. *Globalization and Health*. 9(3):1-9.
14. Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress?. *Metabolism*.49:3-8.
15. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S y Crowe S. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*. 94: 329–354.
16. Bhooshan, K. and Ibrahim, S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2(8): 270-278.
17. Birben E, Murat U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and antioxidant defense. *WAO Journal*. 5(1):9-19.
18. Bohn T. 2014. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*. 72:429-452
19. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. 30(6):609-615.

20. Borrelli GM y Trono D. 2016. Molecular Approaches to Genetically Improve the Accumulation of Health-Promoting Secondary Metabolites in Staple Crops—A Case Study: The Lipoxygenase-B1 Genes and Regulation of the Carotenoid Content in Pasta Products. *International Journal of Molecular Science*. 17(7):1-33.
21. Calderón Salinas, J. V., Muñoz Reyes, E. G. and Quintanar Escorza, M. A. 2013. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB*, 32(2): 53-66.
22. Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones F, Queipo-Ortuño M. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 24(8):1415-1422.
23. Castro Juárez, C. J., Villa Ruano, N., Ramírez García, S. A. and Mosso Gonzál, C. 2014. Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicina*, 19(1): 101-120.
24. Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA. 2003. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *American Journal of Hypertension*. 16(11):973-978.
25. CDC, 2016. ¿Qué es la diabetes?, Consultado el día 9 de junio del 2016: en <http://www.cdc.gov/diabetes/spanish/basics/diabetes.html>.
26. Choi, Y., kim, S. and Lee, M. 2006. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: hepatic and gastrointestinal first-pass effect. *Journal Pharmaceutic Science*, 95(11): 2543-2552.
27. Choi, Y., Lee, M. and Lee, I. 2008. Effects of Diabetes mellitus induced by aloxan on the pharmacokinetics of metformin in Rats: restoration of pharmacokinetic parameters to the control state by insulin treatment. *Journal Pharmaceutic Science*. 11(1): 88-103.
28. Chung, J., Manganiello, V. and Dyck, J. 2012. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends in cell biology*. 22(10): 546-554.
29. Cipriani-Thorne E y Quintanilla A. 2010. Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. *Revista Médica Herediana*. 21(3): 160-170.

30. Coman, C., Rugina, O. and Socaciu, C., 2012. Plants and Natural Compounds with Antidiabetic Action. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40(1): 314-325.
31. Coronado H., M. y otros, 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*. 42(2): 206-212.
32. Cuerda, C. and otros, 2011. Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutrición hospitalaria*. 26(1): 68-78.
33. D'Archivio, M. and otros, 2010. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 1321-1342.
34. De Young L, Yu D, Bateman RM, Brock GB. 2004. Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *Journal of Andrology*. 25:830-836.
35. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidant Redox Signal*. 18(14):1818-92.
36. Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(3):173–289.
37. Domínguez-Ávila JA, García, J, González, G y Rosa, L. 2017. The Antidiabetic Mechanisms of Polyphenols Related to Increased Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) and Insulin Signaling. *Molecules*. 22:1-16.
38. Dryden G, Song M, McClain C. 2006. Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Gastroenterology*. 22(2):165–170.
39. Dueñas M, Cueva C, Muñoz-González I, Jiménez-Girón A, Sánchez-Patán F, Santos-Buelga C, Moreno-Arribas V, Bartolomé B. 2015. Studies on Modulation of Gut

- Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. *Antioxidants*. 4:1-21.
40. El-Desouki NI, Tabl GA, Abdel-Aziz KK, Salim EI, Nazeeh N. 2015. Improvement in beta-islets of Langerhans in alloxan-induced diabetic rats by erythropoietin and spirulina. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 71: 20–31.
41. Ernsberg P y Koletsky RJ. 2012. The Glucose Tolerance Test as a Laboratory Tool with Clinical Implications. InTech. *Glucose Tolerance*, Capítulo 1.
42. Escamilla , C., Cuevas , E. and Guevara , J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 52(2) : 73-75.
43. Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D. and Araujo-Escalona, A. 2012. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud mental*. 35(5): 375-384.
44. Favari L, Arce-Díaz C, Ortíz-Martínez J, Pablo-Pérez S, Soto C, Meléndez-Camargo M. 2013. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Revista Mexicana de Farmacología*. 44(4):53-61.
45. Federici MO, McQuillan J, Biricolti G, Losi S, Lebrech J, Richards C, Miglio C, Norrbacka K. 2018. Utilization Patterns of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Italy: A Retrospective Cohort Study. *Diabetes Therapy*.
46. Folin, C. and Cicocalteu, V., 1927. Tyrosine and tryptophan determination in protein. *Journal of Biology and Chemistry*. 73: 627-650.
47. Giacco F y Brownlee M. 2010. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*. 107:1058-1070.
48. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia S. 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*. 32(1): 169-174.

49. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H y Poutanen K. 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 11:1365-1402.
50. Hayes, J. P. 2008. Diabetes mellitus tipo 1. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 47(2): 90-96.
51. Hernández-Ávila, M., Guitiérrez, J. P. and Reynoso-Noverón, N. 2013. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*. 55(2): 129-136.
52. Iglesias González, R., Barutell Rubio, L., Artola Menéndez, S. and Serrano Martín, R. 2014. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. *Diabetes Práctica*, 5(2): 1-24.
53. INEGI, 2013. Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes. Aguascalientes
54. Jorand, B. 2008. Formas de transformación del conocimiento de la medicina tradicional en los pueblos nahuas del municipio de Hueyapan, Sierra Norte de Puebla.. *Cuicuilco*. 15(44): 181-196.
55. Kim Y, Keogh J y Clifton P. 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 5;8(1): 1-17.
56. Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. *El Manual Moderno*: 97-118.
57. Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. 2009. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 390(2):285-289-
58. Lenz R, Zarate A, Rodríguez J y Ramírez J. 2014. Levels of glycosylated hemoglobin and the difference in the cost of health care for diabetic patients: an econometric study. *Revista médica de Chile*. 42(7):841-849-
59. Lenzen, S. 2007. Alloxan and streptozotocin diabetes. *Diabetologia*. 51: 216-226.

60. Lifshitz, A. 2008. Diabetes Mellitus, consultado el 9 junio del 2016: en http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/may_01_ponencia.html y fecha.
61. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacology Reviews*. 4(8):118-126.
62. Maeda H y Dudareva N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annual Review in Plant Biology*. 63:73-105.
63. Maree A, Peer G, Iaina A, Blum M, Wollman Y, Csernihovsky T, Silverberg D, Cabili S. 1996. Nitric oxide in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Clinical Science*. 90: 379-384.
64. Marín L, Miguélez E, Villar C, Lombó F. 2015. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomedical Research*. 9:1-18.
65. Martínez-Bonfil BP, Pineda-Montero M, López-Laredo AR, Salcedo-Morales G, Evangelista-Lozano S y Trejo-Tapia G. 2013. A propagation procedure for *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae) and antioxidant properties of wild and greenhouse-grown plants. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 12(1):1-14.
66. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. and Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 6: 271-278.
67. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. 2012. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 12(1):5-18.
68. Mayor Oxilia, R. 2010. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*. 5(2): 23-29.

69. Montier Iglesias, A. and otros, 2015. Estrés oxidativo en la diabetes mellitus papel de la vitamina E y antioxidantes endógenos. *Revista Ciencias Médicas*. 19(5): 973-985.
70. Moradabadi L, Montasser-Kouhsari S, Fehresti-Sani M. 2013. Hypoglycemic Effects of Three Medicinal Plants in Experimental Diabetes: Inhibition of Rat Intestinal α -glucosidase and Enhanced Pancreatic Insulin and Cardiac Glut-4 mRNAs Expression. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : Iran Journal of Pharmaceutical Reserch*. 12(3):387-397.
71. Mora-Morales, E. 2014. Estado actual de la diabetes mellitus en el mundo. *Acta Médica Costarricense*. 56(2): 44-46.
72. Morgan, F. and Morgan, S. 2010. SIRT1 Takes a Backseat to AMPK in the Regulation of Insulin Sensitivity by Resveratrol. *Diabetes*. 59(3): 551-553.
73. Múnera-Jaramillo MI, Restrepo-Lozada MA, Gómez-Bahamón LM, Mesa-Suarez R y Ramirez-Puerta BS. 2011. Glycosylated haemoglobin A1c compared to fasting plasma glucose in outpatients referred to a medical laboratory. *Revista de salud pública*. 13 (6): 980-989.
74. Murugan A, Karim M Yusoff M, Tan S, Farida M y Rashid S. 2015. New insights into seaweed polyphenols on glucose homeostasis. *Pharmaceutical biology*. 53(8):1087-1097.
75. Nistor Baldea LA, Martineau LC, Benhaddou-Andaloussi A, Arnason JT, Lévy É, Haddad PS. 2010. Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *Journal of Ethnopharmacology*. 132(2):473-482.
76. Nowotny, K. 2015. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*: 194-222.
77. Núñez Sellés, A. J. 2011. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*. 37: 644-660.

78. Orsini-Federici M, McQuillan J, Biricolti G, Losi S, Lebrec J, Richards C, Miglio C y Norrbacka K. 2018. Utilization Patterns of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Italy: A Retrospective Cohort Study. *Diabetes Therapy*. 9(2): 789-801.
79. Oudot A, Behr-Roussel D, Compagnie S, Caisey S, Le Coz O, Gorny D, Alexandre L, Giuliano F. 2009. Endothelial dysfunction in insulin-resistant rats is associated with oxidative stress and COX pathway dysregulation. *Physiology Research*. 58(4):499-509.
80. Oyagbemi, A. and otros. 2014. Some Selected Medicinal Plants with Antidiabetic Potentials. En: *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-human-health/some-selected-medicinal-plants-with-antidiabetic-potentials>: 95-113.
81. Oyenih, A., Brooks, N., Oguntibeju, O. and Oguntibeju, G. 2014. Antioxidant -Rich Natural Products and Diabetes Mellitus. En: *Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health*. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/antioxidant-antidiabetic-agents-and-human-health/antioxidant-rich-natural-products-and-diabetes-mellitus>:317-345.
82. Ozdal T, Sela A, Xiao J, Boyacioglu D, Chen F, Capanoglu E. 2016. The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*. 8(2):1-36.
83. Parvaneh-Tafreshi A, Jalal R, Darvishalipour S, Sepehri H, Adeli K. 2010. Level of The Brain IGF-I Protein Expression in The Insulin Resistant Animal Model. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 12(1):71-76.
84. Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(4): 320-330.
85. Pennell JP, Millard MM y Ashby MH. 1981. Proteinuria in the Acutely Diabetic Rat and its Response to Insulin Treatment. *Diabetologia*. 21: 54-57.

86. Pereira O, Palay M, Rodríguez A y Neyra R. 2015. Diabetes mellitus and the cardiovascular complications. MEDISAN. 19(5):675-683.
87. Pérez, O., Saba, T., Padrón, M. and Molina, R. 2012. Diabetes mellitus gestacional. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo. 10(1):22-33.
88. Phaniendra A, Jestadi D y Periyasamy L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 30(1):11–26.
89. Pietta P, Minoggio M, Bramati L. 2003. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. Studies in natural products chemistry. 28:257-312.
90. Pressman P, Clemens R, Hayes W. 2017. Bioavailability of micronutrients obtained from supplements and food. Toxicology Research and Application. 1:1-7.
91. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hospitalaria. 27(1):76-89.
92. Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical Intervening Aging. 2(2):219-236.
93. Rajamani S, Suganthi R, Ravichandran MK y Anuradha CV. 2005. Food Seasoning Spices Mixture Improves Glucose Metabolism and Lipid Profile in Fructose-Fed Hyperinsulinemic Rats. Journal of medicinal food. 8 (4); 502–507.
94. Reyes Sanam FA, Pérez-Álvarez M, Alfonso-Figueroa E, Ramírez-Estupiñan M y Jiménez Rizo Y. 2016. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. Correo Científico Médico. 20(1): 98-121.
95. Ríos-Martínez W, García-Salazar AM, Ruano-Herrera L, Espinosa-Velasco MJ y Hernández-Valencia M. 2014. Complicaciones obstétricas de la diabetes gestacional: criterios de la IADPSG y HAPO. Perinatología y reproducción humana. 28(1): 27-32.

96. Riveros, M., Parada, A. and Pettinelli, P. 2014. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutrición Hospitalaria*. 29(3): 491-499.
97. Rohilla, A. and Ali, S. 2012. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 3(2): 819-823.
98. Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gómez-Pérez FJ y Olaiz G. 2005. Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexico. *Archives of Medical Research*. 36:188–196
99. Rutter MK, Parise H, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Meigs JB, Nesto RW, Wilson PW y Vasan RS. 2003. Impact of glucose intolerance and insulin resistance on cardiac structure and function: sex-related differences in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 28;107(3):448-54.
100. Sánchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F. 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of Science Food and Agriculture*. 76:270-276.
101. Scalbert, A., Johnson, I. and Slatmarsh, M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond^{1,2,3}. *American Journal of Clinical Nutrition*. 81(1): 2155-2175.
102. Schmedes, A. and Holmer, G. 1989. A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 66(6): 813-817.
103. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner J. 2007. A review interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal Nutrition Biochemistry*. 18(9):567–579.
104. Shams Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Reza Oveisi M, Sadeghi N, Jannat B, Mohammad Ranjbar A, Gholam N y Moridi, T. 2011. Comparative Antioxidant

- Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 10 (3): 519-524.
105. Shing-Leow MK. 2016. Glycated Hemoglobin (HbA1c): Clinical Applications of a Mathematical Concept. Acta informatica medica. 24(4): 233-238.
106. Singleton, V. and Rossi, A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Environment Vitic. 16: 144-158.
107. Skibola, C. and Smith, M. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. free radical biology and medicine. 29(3):375-383.
108. Sudasunghe HP y Peiris DC. 2018. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of aqueous leaf extract of *Passiflora suberosa* L. PeerJ. 6:e4389.
109. Sutariya B y Saraf M. 2018. α -asarone reduce proteinuria by restoring antioxidant enzymes activities and regulating necrosis factor κ B signaling pathway in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. Biomed Pharmacother. 98:318-324.
110. Szkudelski T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Physiology Research. 50: 536-546.
111. Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison J, Rémésy C. 2003. Anthocyanins Are Efficiently Absorbed from the Stomach in Anesthetized Rats. Journal of Nutrition. 133(12):4178-4182.
112. Tran L, Yuen V y McNeill J. 2009. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. Molecular Cell Biochemistry. 332: 145-159.
113. Tzina V y Galili G. 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. Molecular Plant. 3(6):956-72.
114. Urquiza-Martínez MV y Fenton-Navarro B. 2016. Antioxidant Capacity of Food. Free Radicals and Antioxidants. 6(1): 1-12.

115. Valentine W, Brun K, Boye K y Pollock R. 2018. Treating Type 1 Diabetes Mellitus with a Rapid-Acting Analog Insulin Regimen vs. Regular Human Insulin in Germany: A Long-Term Cost-Effectiveness Evaluation. *Appl Health Econ Health Policy*.
116. Van Duynhoven J, Vaughan E, Jacobs DM, Kemperman R, van Velzen E, Gross G, Roger L, Possemiers S, Smilde A, Doré J, Westerhuis J, Van de Wiele T. 2011. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(1):4531-4538.
117. Vargas-Vargas, M. 2016. 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. Morelia: Tesis Maestría en Ciencias de la Salud. UMSNH.
118. Vasiljević A, Bursać B, Djordjevic A, Milutinović DV, Nikolić M, Matić G, Veličković N. 2014. Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11 β HSD1 expression in the liver of Wistar rats. *European Journal of Nutrition*. 53(6):1393-1402.
119. Wanniarachchi K, Peiris D y Ratnasooriya W.D. 2009. Antihyperglycemic and hypoglycemic activities of *Phyllanthus debilis* aqueous plant extract in mice. *Pharmaceutical Biology*. 47(3): 260–265.
120. Wong-ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang M, Tieleman DP y Monticelli L. 2007. Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Biophysical Journal*. 93:4225-4236.
121. Yamashita Y, Wang L, Nanba F, Ito C, Toda T, Ashida H. 2016. Procyanidin Promotes Translocation of Glucose Transporter 4 in Muscle of Mice through Activation of Insulin and AMPK Signaling Pathways. *PLOS ONE*. 11(9):e0161704.
122. Yin W, Qin W y Gao Y. 2017. Urine glucose levels are disordered before blood glucose level increase was observed in Zucker diabetic fatty rats. *Science China life science*. 1-5.

123. Yu T, Robotham JL y Yoon Y. 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(8):2653-2658.

XII. ANEXOS

Anexo 1

26 de octubre 2017.

Dra. Bertha Fenton Navarro
Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo

PRESENTE:

Hago de su conocimiento la determinación realizada por la M. en C. Verónica Juárez Jaimes y Juan Ismael Calzada, del ejemplar recolectado por Bertha Fenton N. y Francisco Orozco Montes (1), en la calle Ortiz Rubio, Charo, Michoacán.

El cual se ubica en la familia Lythraceae

Especie: ***Cuphea procumbens* Ortega**

Cabe señalar que esta determinación botánica está corroborada con ejemplares depositados en el herbario, y es válida solamente para el ejemplar referido en la solicitud OD03102017, el cual se encuentra depositado en el acervo con el número de folio 1460945.

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente,

M. en C. Verónica Juárez Jaimes
Programa de determinación

ANEXO2

