



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCÉMICA
Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS
DE LAS HOJAS DE *Justicia spicigera* EN RATAS
DIABÉTICAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

QFB. JOSÉ ALBERTO MARTÍNEZ MORA

ASESOR:

D. C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

Morelia, Michoacán.

Octubre de 2017.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD
MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO EL APOYO ECONÓMICO
PARCIAL DEL DONATIVO DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA (2.16-2017).

Dedicatoria

*A mis padres, **Clara** y **Q.F.B. José Alberto**, por su apoyo incondicional, por brindarme su confianza, sus palabras de aliento, sus consejos ante cualquier circunstancia que me ayudan a crecer como persona y por el gran amor que siempre me han demostrado.*

*A mis hermanos, **Lic. María Asunción** y **Luis Armando**, por su apoyo en mis actividades curriculares, extracurriculares y moral, por sus consejos, por hacerme creer en mí y no dejarme vencer. Crecemos aprendiendo uno del otro.*

*A mi novia, **Q.F.B. Cecilia Esperanza**, que es el amor de mi vida, a la que le dedico todo mi trabajo y agradezco por ser mi motor, mis ganas de seguir adelante, por ser paciente y comprensiva conmigo, por creer en mí, por su apoyo incondicional en todo momento, por su grata, amena y divertida compañía después de trabajar; Te amo.*

Agradecimientos personales

Al Dr. Alfredo Saavedra y a Mónica Clemente, por permitirme trabajar de nuevo en su laboratorio, por su apoyo y amistad, por estar siempre ahí para cualquier duda académica y consejos personales, por sus palabras de aliento para seguir en este camino.

A la Dra. Ruth Noriega, que me brindó la confianza y apoyo para usar las instalaciones de su laboratorio y detalles técnicos a lo largo del proyecto.

Al Dr. Rafael Salgado Garciglia, encargado del laboratorio de Biotecnología Vegetal, del que recibí consejos académicos en mi proyecto.

Al Comité Tutorial, por sus consejos y apoyo que recibí para enriquecer y realizar de una buena manera mi proyecto de investigación.

A mis amigos con los que conviví en el laboratorio de Bioquímica: D.C. Jorge Arturo, que también estuvo ahí para cualquier duda académica, consejos y apoyo moral en este caminar, al Q.F.B. Donovan Javier, que me hizo pasar de manera amena el tiempo en el laboratorio, por su gran apoyo en mi proyecto, a la Q.F.B. Marina Villicaña, que desde manera temprana el Dr. Saavedra confió en mí, a fin de que me auxiliara y fuera como mi brazo derecho dentro de este proyecto y a quien agradezco que haya estado ahí siempre en todas y cada una de las diferentes actividades que le fueron encomendadas.

A mis Amigas, las Q.F.B.: Gabriela Benites, Alejandra Cervantes, Karla Manríquez y Anabell Benitez, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

A mis Amigos (as) de la preparatoria porque siempre estuvieron pendientes de mi progreso académico y me dieron su apoyo cuando lo necesite, por acompañarme a lo largo de este proceso, les agradezco la confianza que depositaron en mí y por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca voy a olvidar.

Reconocimientos Institucionales



*A la Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo,
por brindarme la oportunidad de concluir con
mis estudios de licenciatura, graduándome
como **Químico Farmacobiólogo**.*

*Al Instituto de Investigaciones
Químico- Biológicas,
por permitirme seguir formándome
académicamente y culminar con mis
estudios de Posgrado, como:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental.*



*Al Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología,
por otorgarme la beca durante mi
instancia en mis estudios de Posgrado
para así finalizar con éxito.*

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AA	Aminoácido
Ác. asc.	Ácido ascórbico
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
cm	Centímetros
CTE	Cadena transportadora de electrones
DM	Diabetes Mellitus
DM 1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM 2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracil
EJs	Extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FID	Federación Internacional de la Diabetes
g	Gramos
GLUT	Transportadores de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH-Rd	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HClO	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KDa	Kilodaltones
MDA	Malondialdehído
µm	Micrómetro
µl	Microlitro
MoSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MPO	Mieloperoxidasa
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH oxidasa	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

NADPH ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
O ₂	Oxígeno molecular
PFGA	Productos finales de la glucación avanzada
Pi	Fosfato inorgánico
RL	Radicales libres
S.D.	Desviación estándar
SOD	Superóxido dismutasa
STZ	Estreptozotocina

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE GENERAL I

	Página
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Antecedente.....	4
3.2 Diabetes Mellitus.....	7
3.2.1 Definición, causas, síntomas y riesgos.....	7
3.2.2 Clasificación y diagnóstico de la diabetes.....	8
3.2.3 Estadística de la diabetes a nivel mundial y en México.....	8
3.3 Transportadores de glucosa (GLUT).....	9
3.3.1 Órganos insulino dependientes y órganos no insulino dependientes.....	11
3.4 Complicaciones macrovasculares y la dislipidemia diabética.....	11
3.4.1 Anatomía y funciones del riñón.....	12
3.4.2 Pruebas de la función renal.....	14
3.4.2.1 Urea.....	15
3.4.2.2 Creatinina.....	15
3.4.2.3 Complicaciones microvasculares y la nefropatía diabética.....	15
3.4.3 Anatomía del cerebro.....	16
3.4.3.1 Diabetes y neuropatías.....	17
3.4.3.2 Metabolismo de glucosa en el cerebro.....	18
3.5 La mitocondria.....	21
3.5.1 Hiperglucemia y el mal funcionamiento de la mitocondria.....	24
3.6 Estrés oxidativo.....	24
3.6.1 Especies reactivas de oxígeno y sus características.....	24

3.6.2 Cadena transportadora de electrones y generación de RL y ERO.....	26
3.7 Defensas antioxidantes mitocondriales.....	28
3.8 Antioxidante y tipos.....	29
3.8.1 Antioxidantes endógenos (Enzimas antioxidantes).....	29
3.8.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	29
3.8.1.2 Catalasa (CAT).....	30
3.8.1.3 Glutati3n reductasa (GR).....	31
3.8.1.4 Glutati3n peroxidasa (GPx).....	31
3.8.2 Antioxidantes no enzimáticos y ex3genos.....	33
3.8.2.1 Glutati3n (GSH).....	33
3.8.2.2 Flavonoides.....	35
3.8.2.3 Las plantas como antioxidantes naturales.....	36
3.9 G3nero <i>Justicia</i>	38
3.9.1 Taxonomía de <i>Justicia spicigera</i>	39
3.9.2 Descripci3n botánica de <i>Justicia spicigera</i>	39
3.9.3 Distribuci3n geogr3fica de <i>Justicia spicigera</i>	41
3.9.4 Usos de <i>Justicia spicigera</i> en la medicina tradicional Mexicana.....	42
3.9.5 Estudio fitoquímico de <i>Justicia spicigera</i>	43
3.10 Métodos de evaluaci3n de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	45
3.10.1 Reducci3n del radical DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	46
3.10.2 Método de reducci3n del fosfomolibdeno.....	47
3.10.3 Poder reductor.....	48
3.10.4 Antilipoperoxidaci3n.....	48
4. Justificaci3n.....	49
5. Hip3tesis.....	49
6. Objetivo general.....	49
6.1 Objetivos específcos.....	50
7. Materiales y métodos.....	50
7.1 Reactivos.....	50

7.2	Identificación y recolección de la planta <i>Justicia spicigera</i>	50
7.3	Obtención de los extractos de las hojas de <i>Justicia Spicigera</i>	51
7.3.1	Rendimiento de los extractos.....	51
7.4	Diseño experimental.....	52
7.4.1	Animales.....	53
7.4.1.1	Determinación de los niveles de glucemia y peso durante el tratamiento.....	53
7.4.1.2	Medición de la ingesta de alimento y agua durante el tratamiento.....	54
7.4.2	Inducción de la diabetes a las ratas.....	54
7.4.3	Eutanacia de las ratas.....	54
7.4.4	Aislamiento de mitocondrias de riñón.....	54
7.4.5	Aislamiento de mitocondrias de cerebro.....	55
7.4.6	Determinación de la concentración de proteína mitocondrial.....	55
7.5	Cuantificación de las concentraciones de glutatión total, reducido y oxidado.....	55
7.6	Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa.....	56
7.7	Determinación de la actividad de la catalasa.....	56
7.8	Análisis serológico de las muestras sanguíneas.....	57
7.9	Pruebas de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	57
7.9.1	Reducción del radical DPPH' (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	57
7.9.2	Reducción del fosfomolibdeno (VI).....	58
7.9.3	Poder reductor.....	58
7.9.4	Antilipoperoxidación.....	59
7.10	Análisis estadístico.....	59
8.	Resultados.....	60
9.	Discusión.....	83
10.	Resumen de resultados.....	89
11.	Conclusión.....	90
12.	Perspectivas.....	90
13.	Referencias.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS II

Página

Figura 1. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> en preadipocitos de rata y de humano.....	5
Figura 2. Localización de los riñones en el ser humano.....	12
Figura 3. Partes anatómicas del riñón.....	13
Figura 4. Lóbulos cerebrales (vista lateral).....	17
Figura 5. Esquema de la vía glucolítica.....	19
Figura 6. Ciclo de Krebs.....	20
Figura 7. Respiración celular.....	21
Figura 8. Esquema de la estructura de la mitocondria.....	22
Figura 9. Fosforilación oxidativa.....	23
Figura 10. Reacción de la glutatión peroxidasa.....	32
Figura 11. Esquema general de la reducción del anión radical superóxido a través de los sistemas enzimáticos endógenos antioxidantes.....	33
Figura 12. Estructura del glutatión.....	34
Figura 13. Síntesis y ciclo redox del glutatión.....	35
Figura 14. Parte aérea de <i>Justicia spicigera</i>	40
Figura 15. Hojas de <i>Justicia spicigera</i>	40
Figura 16. Flor de <i>Justicia spicigera</i>	41
Figura 17. Distribución geográfica de <i>Justicia spicigera</i>	41
Figura 18. Estructura química del kaempferol.....	44
Figura 19. Estructura del DPPH' y la reducción difenil-picrilhidrazina (DPPH-H) por un antioxidante.....	47
Figura 20. Reacción entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído.....	49
Figura 21. Glucemias durante el tratamiento de los grupos control (Aceite de maíz) y los tratados con el extracto hexánico.....	60
Figura 22. Glucemias durante el tratamiento de los grupos control (DMSO) y tratados con el extracto acetato de etilo y etanólico.....	61

Figura 23. Peso corporal (g) durante el tratamiento de los grupos control (Aceite de maíz) y los tratados con el extracto hexánico.....	62
Figura 24. Peso corporal (g) durante el tratamiento de los grupos control (DMSO) y los tratados con los extractos acetato de etilo y etanólico.....	63
Figura 25. Porcentaje de reducción del radical DPPH·	65
Figura 26. Porcentaje de reducción del Molibdeno (VI)	66
Figura 27. Poder reductor del Fe ⁺³	67
Figura 28. Porcentaje de antilipoperoxidación.....	68
Figura 29. Rendimiento de los extractos de las hojas de <i>Justicia spicigera</i>	82

ÍNDICE DE GRÁFICAS III

Gráfica 1. Efecto del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> a 100 mg/kg sobre los niveles de glucemia después de una sola administración oral de 2 g/kg de glucosa en ratas Wistar macho diabéticas.....	6
---	---

ÍNDICE DE TABLAS IV

	Página
Tabla 1. Efecto hipoglucémico de la administración oral del extracto etanólico de <i>Justicia spicigera</i> en ratas normoglucémicas.....	5
Tabla 2. Características de los transportadores GLUT.....	10
Tabla 3. Formación de radicales libres a través de fuentes enzimáticas y no enzimáticas.....	28
Tabla 4. Actividad biológica de algunas especies del género <i>Justicia</i>	39
Tabla 5. Taxonomía de <i>Justicia spicigera</i>	39
Tabla 6. Usos de <i>Justicia spicigera</i> en la medicina tradicional Mexicana.....	42
Tabla 7. Valores normales de parámetros serológicos de glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos en ratas Wistar macho.....	57
Tabla 8. Efecto de los extractos sobre el peso corporal, porcentaje de ganancia de peso, consumo de agua y alimento al término de 30 días de tratamiento.....	64
Tabla 9. Pruebas serológicas (Glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos) de ratas	

administradas durante 30 días con aceite de maíz y extracto hexánico de <i>Justicia spicigera</i>	69
Tabla 10. Pruebas serológicas (Glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos) de ratas administradas durante 30 días con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de <i>Justicia spicigera</i>	71
Tabla 11. Actividad de la superóxido dismutasa en mitocondrias de riñón y cerebro de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de <i>Juticia spicigera</i>	73
Tabla 12. Actividad de la superóxido dismutasa en mitocondrias de riñón y cerebro de ratas administradas con el DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de <i>J. spicigera</i> ...	74
Tabla 13. Actividad de la catalasa de riñón y cerebro de ratas administradas con aceite demaíz y extracto hexánico de <i>Justicia spicigera</i>	75
Tabla 14. Actividad de la catalasa de riñón y cerebro de ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de <i>Justicia spicigera</i>	76
Tabla 15. Concentraciones de glutatión total (GSH _T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de cerebro de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de <i>Justicia spicigera</i>	77
Tabla 16. Concentraciones de glutatión total (GSH _T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de cerebro de ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de <i>Justicia spicigera</i>	78
Tabla 17. Concentraciones de glutatión total (GSH _T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de riñón de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de <i>Justicia spicigera</i>	80
Tabla 18. Concentraciones de glutatión total (GSH _T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de riñón de ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de <i>Justicia spicigera</i>	81

1. RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, donde existe una deficiencia absoluta o relativa en la secreción y/o acción de la insulina, o ambos. Actualmente, se han relacionado las complicaciones de la DM con el estrés oxidativo, provocando daño oxidativo a biomoléculas que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa, ya que se encuentran disminuidos. Dicho daño oxidativo puede ser contrarrestado con la administración de antioxidantes como los presentes en las hojas de *Justicia spicigera*, de la cual se usaron 3 extractos con solventes de diferente polaridad: hexano, acetato de etilo y etanol se les realizaron las pruebas antioxidantes *in vitro* de antilipoperoxidación, poder reductor, reducción del fosfomolibdeno y reducción del radical DPPH. En la reducción del radical DPPH, los extractos hexánico y etanólico igualaron la reducción del ácido ascórbico con un 100 % y el extracto acetato de etilo un 70 %. Para la reducción del fosfomolibdeno, el extracto hexánico lo redujo un 28 %, el extracto de acetato de etilo un 94 % y el extracto etanólico un 100 %. La reducción del Fe^{+3} del extracto hexánico fue de un 9 %; del extracto de acetato de etilo 17 % y del extracto etanólico lo redujo con un 25 %. En la técnica de antilipoperoxidación, el extracto hexánico y etanólico inhibieron la lipoperoxidación un 82 y 79 % respectivamente, mientras que el extracto de acetato de etilo un 53 %. Para las pruebas *in vivo* se usaron ratas Wistar macho a las que se les extrajeron los riñones y el cerebro. La actividad de la SOD en mitocondrias de riñón y cerebro no se vió afectada por ninguno de los extractos de *Justicia spicigera*. La actividad de la enzima catalasa en el cerebro, en los grupos normoglucémicos administrados con los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico, presentaron actividad de 23.8, 24 y 23 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ consumido/min/mg de proteína, respectivamente; en los grupos diabéticos, la actividad de la catalasa fue de 19, 19.8 y 22.3 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ consumido/min/mg de proteína, respectivamente, normalizando la actividad de esta enzima los extractos acetato de etilo y etanólico. El extracto hexánico no modificó la actividad de la catalasa de riñón, estando disminuida en el grupo diabético (23.8 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ consumido/min/mg de proteína) a diferencia de los extractos acetato de etilo y etanólico que restauraron su actividad 24.5 y 28.3 $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2$ consumido/min/mg de proteína. En las pruebas serológicas, el extracto hexánico solo presentó efecto hipolipidémico en el grupo diabético. Los extractos de acetato de etilo y etanólico, ejercieron un efecto hipoglucémico e hipotrigliceridémico en ratas diabéticas. En conclusión, los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* presentan efectos benéficos a nivel serológico y antioxidante.

Palabras clave: Diabetes, estrés oxidativo, antioxidante, mitocondria, *Justicia spicigera*.

2. ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia, with alterations in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, where there is an absolute deficiency or relative to the secretion and / or action of insulin, or both. Currently, the complications of DM with oxidative stress have been related, causing oxidative damage to biomolecules that can not be counteracted by the defense antioxidant systems, since they are diminished. Such oxidative damage can be counteracted by the administration of antioxidants such as the products in the leaves of *Justicia spicigera*, from which 3 extracts were dried with solvents of different polarity: hexane, ethanol acetate and ethanol were tested in vitro antioxidants of antilipoperoxidación, reducer of power, reduction of the fosfomolibdeno and reduction of the radical DPPH. In the reduction of radical DPPH, hexane extracts and anomalous ethanol the reduction of ascorbic acid with 100% and the extract ethyl acetate 70%. For the reduction of the phosphomolybdenum, the hexane extract reduces it by 28%, the ethyl acetate extract by 94% and the ethanolic extract by 100%. The reduction of Fe + 3 in the hexane extract was 9%; of the extract of ethyl acetate 17% and of the ethanolic extract with 25%. In the antilipoperoxidation technique, the hexanic and ethanolic extract inhibited lipoperoxidation by 82 and 79% respectively, while the extract of ethyl acetate by 53%. For in vivo tests, male Wistar rats were used to extract the kidneys and brain. The activity of SOD in mitochondria of kidney and brain was not affected by any of the extracts of *Justicia spicigera*. The activity of the enzyme catalase in the brain, in the normoglycemic groups administered with hexane, ethyl acetate and ethanolic extracts, showed the activity of 23.8, 24 and 23 μmol of H_2O_2 consumed / min / mg of protein, respectively; in the diabetic groups, catalase activity of 19, 19.8 and 22.3 μmol of H_2O_2 consumed / min / mg protein, respectively, normalizing the activity of this enzyme to the ethyl acetate and ethanolic extracts. The hexane extract did not modify the activity of the kidney catalase, decreased in the diabetic group (23.8 μmol of H_2O_2 consumed / min / mg of protein), a difference of the extracts of ethyl acetate and ethanol that restored its activity 24,5 and 28.3 μmol of H_2O_2 consumed / min / mg protein. In serological tests, the hexanic extract alone, the hypolipidemic effect in the diabetic group. Ethyl acetate and ethanol extracts were exerted on a hypoglycemic and hypotriglyceridemic effect in diabetic rats. In conclusion, the hexane extracts, the ethyl acetate and the ethanol from the leaves of Justice.

3. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, donde existe una deficiencia absoluta o relativa en la secreción y/o acción de la insulina, o ambos (OMS, 1999). La DM es una enfermedad crónico-degenerativa que está asociada con alto riesgo de aterosclerosis, daño renal, neuronal y ceguera; lo que la convierte en una de las principales causas de morbi-mortalidad, ya que la prevalencia de la DM está aumentando en todo el mundo, por lo que se considera un problema de salud pública a nivel internacional. Actualmente, se han relacionado las complicaciones de la DM con el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que provoca daño oxidativo a las biomoléculas que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa, lo que se conoce como estrés oxidativo (EO). La mayoría de las ERO son de origen endógeno, siendo subproductos de reacciones normales y esenciales, como por ejemplo en el metabolismo y en la generación de energía en la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa. Las enfermedades metabólicas, como la DM, tienen grandes posibilidades de tener una participación de elementos oxidativos en su génesis, evolución o complicaciones, ya que pueden generar estados oxidantes o afectar la generación o la eficiencia de los mecanismos antioxidantes (Quintanar-Escorza *et al.*, 2009). Cuando un exceso de RL se forma, puede causar cambios en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), se generan efectos letales en las células por la oxidación de lípidos, proteínas y DNA, y ocasiona reacciones en cadena que perpetúa la creación de más RL, por lo que aumenta el daño oxidativo a los órganos (Krishnaiah *et al.*, 2011). Afortunadamente, los daños se pueden disminuir con la administración de dosis adecuadas de antioxidantes exógenos, lo que pudiera permitir a los diabéticos tener mejor calidad de vida, pues es de esperar que las complicaciones ocasionadas principalmente por la producción excesiva de RL y ERO disminuyan con la administración de antioxidantes. Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones de oxidación que causan daño a las biomoléculas. En

los últimos años, los antioxidantes naturales provenientes de plantas como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión, carotenoides y flavonoides, han sido frecuentemente usados en diferentes campos de la industria farmacéutica (Karre *et al.*, 2013). Las investigaciones en México con plantas medicinales han ido en aumento, lo que indica la importancia de la medicina popular en nuestro país. Actualmente, la literatura científica apoya el uso de plantas, extractos o sus compuestos activos contra varias enfermedades (Huerta, 1997), siendo *Justicia spicigera* una planta a la cual se le ha atribuido que alivia más de 20 malestares y enfermedades entre ellas, el tratamiento para la diabetes.

3.1. Antecedente

Ortíz-Andrade *et al.*, (2012), evaluaron la citotoxicidad del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la proliferación de las células (preadipocitos) normales de ratas y de humanos; además analizaron el efecto hipoglucémico en ratas normoglucémicas y diabéticas; en su trabajo reportaron que el extracto etanólico de *Justicia spicigera* a 100 mg/kg mantuvo la viabilidad de los preadipocitos de ratas y de humanos entre un 80 y un 95 %, mientras que a concentraciones más bajas (10 y 50 mg/kg), el extracto carecía de efectos citotóxicos (*Figura 1*).

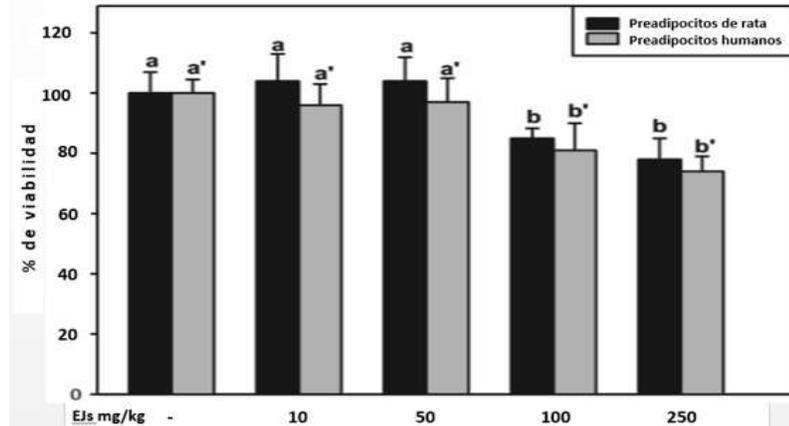


Figura 1. Efecto del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la viabilidad de preadipocitos de rata y de humano (Ortíz-Andrade *et al.*, 2012).

En el mismo trabajo, se reportó que el extracto etanólico de *Justicia spicigera* presentó actividad hipoglucémica en ratas normoglucémicas (Tabla 1) y diabéticas (Gráfica 1). Esta evidencia justificó su uso empírico en la medicina tradicional para el tratamiento de la DM.

Tabla 1. Efecto hipoglucémico de la administración oral del extracto etanólico de *Justicia spicigera* y como vehículo, solución salina isotónica (SSI) en ratas normoglucémicas (Ortíz-Andrade *et al.*, 2012). Los datos son el porcentaje de variación de glucemia.

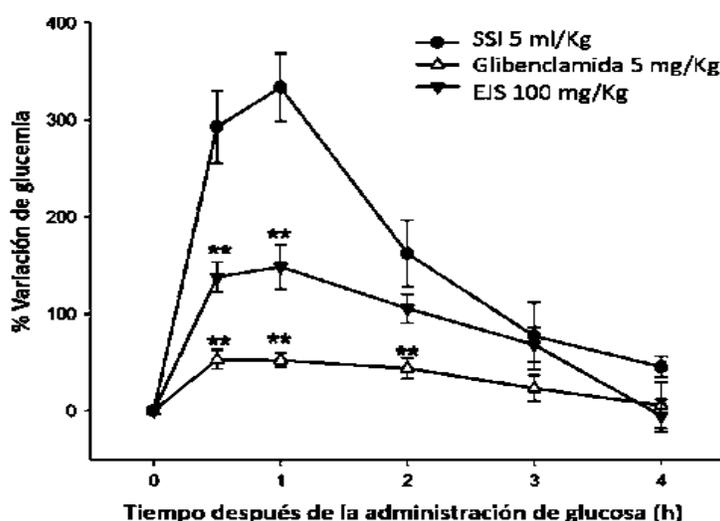
Tiempo (h)	SSI	Extracto etanólico de <i>J. spicigera</i>		
		10 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
0.5	69.99 ± 8.18	42.85 ± 5.55 ^a	40.14 ± 6.82 ^a	44.37 ± 5.03 ^a
1.0	102.46 ± 9.28	60.95 ± 5.06 ^a	64.68 ± 1.23 ^a	62.65 ± 7.39 ^a
2.0	59.53 ± 6.41	17.06 ± 6.41 ^a	12.90 ± 4.57 ^a	11.32 ± 5.50 ^a
3.0	16.94 ± 1.03	10.46 ± 5.20	8.30 ± 7.83	0.30 ± 4.25 ^a
4.0	32.24 ± 5.83	-5.41 ± 6.05 ^a	-12.22 ± 6.59 ^a	-9.17 ± 6.76 ^a

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

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

El valor negativo indica la disminución de la glucemia comparada con el tiempo cero.

Gráfica 1. Efecto del extracto etanólico de *Justicia spicigera* a 100 mg/kg sobre los niveles de glucemia después de una sola administración oral de 2 g/kg de glucosa en ratas Wistar macho diabéticas (Ortíz-Andrade *et al.*, 2012). Se usó glibenclamida como control positivo. Los datos representan el porcentaje de variación de glucemia.



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

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

3.2 Diabetes Mellitus

3.2.1 Definición, causas, síntomas y riesgos

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, donde existe una deficiencia absoluta o relativa en la secreción y/o acción de la insulina, o ambos (OMS, 1999). La insulina es una hormona polipeptídica producida por las células β de los islotes de Langerhans (porción endocrina), secretada por el páncreas, que permite que la glucosa de los alimentos se incorpore a las células, en donde se convierte en energía para que funcionen los músculos y los tejidos. Así es que en una persona con DM no se logra la internalización de la glucosa, por lo que queda en el torrente sanguíneo, causando hiperglucemia y dañando los órganos como los ojos, riñones, corazón y cerebro con el paso del tiempo (FID, 2015).

La diabetes mellitus tipo I (DM 1) es autoinmune, es decir, los anticuerpos destruyen progresivamente las células β del páncreas, que es donde se produce la insulina y por lo tanto, el paciente con este tipo de DM no produce esta hormona. Personas que padecen este tipo de diabetes necesitan la administración diaria de insulina para mantener sus niveles de glucemia normales (Brownlee, 2005).

En la diabetes mellitus tipo II (DM 2) se produce una interacción entre una disminución en la producción de insulina y una resistencia a ella en los tejidos del cuerpo. El propio envejecimiento produce un descenso en la producción de insulina, algunos fármacos, algunas enfermedades pancreáticas, como la pancreatitis crónica o la obesidad, disminuyen la capacidad de acción de la insulina por una mayor resistencia periférica debido a la grasa presente (Brownlee, 2005).

Los síntomas que suelen presentarse en una persona diabética son: polidipsia, polifagia, poliuria, pérdida de peso, visión borrosa, también puede observarse deterioro del crecimiento y susceptibilidad a ciertas infecciones (Brownlee, 2005).

El paciente diabético presenta 40 veces más el riesgo de amputación de los miembros inferiores, 25 veces más riesgo de insuficiencia renal terminal, 20 veces más de

presentar ceguera, de 2 a 5 veces más riesgo de presentar infarto agudo al miocardio y a los accidentes cerebrovasculares (Mann, 2002). También puede desarrollar hipertensión y dislipidemia (Klein *et al.*, 2002).

3.2.2 Clasificación y diagnóstico de la diabetes

Existen varios tipos de DM, pero dentro de los principales encontramos a la diabetes mellitus tipo I (DM 1) y la diabetes mellitus tipo II (DM 2). La DM 1 puede afectar a personas de cualquier edad. El número de personas que desarrollan DM 1 aumenta cada año. Esto se debe a los cambios de factores ambientales, a circunstancias durante el desarrollo en el útero, o a la mala alimentación durante las primeras etapas de vida. En la DM 2, se disminuye la sensibilidad a la insulina en los tejidos blanco y es identificada como resistencia a la insulina. En este tipo de diabetes, el organismo puede producir insulina pero, ya sea que no es suficiente, o el organismo no responde a sus efectos y provoca una acumulación de glucosa en la sangre (hiperglucemia). Suele aparecer en adultos, pero cada vez hay más casos de niños y adolescentes que la padecen (FID, 2015).

De acuerdo con Grundy *et al.*, 1999, los criterios que establecen el comité de expertos sobre el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus para el diagnóstico de la diabetes son:

- 1) Niveles de glucemia en ayunas > 126 mg/dl (7.0 mmol/L).
- 2) Glucosa postprandial de 2 horas > 200 mg/dL (11.1mmol/L).
- 3) Hemoglobina glucosada.

3.2.3 Estadística de la diabetes a nivel mundial y en México

La DM y sus complicaciones son de las mayores causas de muerte en muchos países. Se estima que 1 de cada 11 adultos de la población mundial tiene DM. Aproximadamente 5 millones de personas con edad comprendida entre los 20 y 79 años murieron a causa de la DM durante el año 2015. Con un promedio de 12.9% (10.8 - 14.5%) de la población adulta afectada, Norte América y la región del Caribe tienen la más alta

prevalencia de DM en comparación con otros países, donde México ocupa el séptimo lugar. Un promedio estimado de 44.3 (37.1 - 49.9) millones de personas con DM de entre 20 - 79 años de edad viven en Norte América y el Caribe, de los cuales 13.3 millones (29.9%) no son diagnosticadas (FID, 2015). A nivel mundial, se estima que hay 415 millones de personas con DM, de las cuales el 30 % no han sido diagnosticados. Según la Federación Internacional de la Diabetes (FID), en México la prevalencia de este padecimiento es del 15.6 % de la población total (125 millones). La DM 2 representa entre el 85 % y el 90 % del total de los pacientes diabéticos en los países de ingresos altos y puede representar un porcentaje aún mayor en los países de ingresos medios y bajos. La DM 1, aunque menos común, con un 10 % – 15 % de prevalencia, está aumentando cada año en todo el mundo. La DM 1 es uno de los trastornos metabólicos más comunes en la infancia. El número de niños que desarrollan este tipo de DM está aumentando cada año a nivel mundial; durante el 2015, México ocupó el décimo lugar en el número de casos de DM 1 en la infancia (FID, 2015).

3.3 Transportadores de glucosa (GLUT)

El transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células representa uno de los eventos más importantes del transporte de nutrientes, ya que esta molécula tiene un papel central en el metabolismo y en la homeostasis celular. El ingreso de la glucosa a las células se realiza mediante dos tipos de proteínas acarreadoras: Los transportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT) y los sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT). Para lograr la internalización de la glucosa, las células tienen transportadores específicos llamados transportadores GLUT, que son una familia de proteínas transmembranales que se encargan del transporte de glucosa del torrente sanguíneo a la célula. Se han identificado 13 de ellas (GLUT 1 - GLUT 13) divididas en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, tales como su especificidad al sustrato (glucosa, fructosa y/o galactosa) (Castrejón, 2007).

Tabla 2. Características de los transportadores GLUT. Tomado y modificado de Díaz, H. y Burgos, H. (2002).

ISOFORMAS	NÚMERO DE AA	MONOSACÁRIDOS QUE TRANSPORTA	LOCALIZACIÓN EN LOS TEJIDOS	FUNCIÓN
GLUT 1	664	Glucosa, Galactosa	Eritrocito, barreras hematoencefálica, placentaria y de la retina, nefrona	Ingreso basal de glucosa
GLUT 2	522	Glucosa, Galactosa, Fructosa	Células β pancreáticas, hígado, intestino delgado, neurona proximal	Sensor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en la membrana basolateral del intestino y riñón
GLUT 3	596	Glucosa, Galactosa	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón	Ingreso basal de glucosa
GLUT 4	509	Glucosa	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT 5	501	Fructosa	Yeyuno, espermatozoides, riñón, células de la microglía	Transporte de fructosa
GLUT 6	507	Glucosa	Cerebro, bazo y leucocitos	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT 8	477	Glucosa	Testículos y placenta	Ingreso de glucosa
GLUT 9	540	Glucosa	Riñón e hígado	Ingreso de glucosa
GLUT 10	541	Glucosa	Hígado y páncreas	Ingreso de glucosa
GLUT 11	496	Glucosa	Músculo esquelético y Corazón	Ingreso de glucosa
GLUT 12	617	Glucosa	Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado	Ingreso de glucosa
GLUT 13	629	Glucosa	Cerebro	Ingreso de glucosa

3.3.1 Órganos insulino dependientes y órganos no insulino dependientes

Cada órgano del cuerpo tiene transportadores de glucosa (GLUT) diferentes y de acuerdo con esto, se dividen en 2 grupos: órganos insulino dependientes y órganos no dependientes de insulina; en donde, los órganos insulino dependientes, como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el tejido cardiaco tienen el transportador dependiente de insulina GLUT 4. Respecto a los órganos no dependientes de insulina, podemos mencionar el cerebro (GLUT 1 y 3); el hígado (GLUT 2), el riñón (GLUT 2) y los eritrocitos (GLUT 1 y 3). Dado que estos órganos necesitan siempre la translocación de la glucosa al interior de la célula para su buen funcionamiento, no necesitan la presencia de la insulina, por lo que son dañados por la hiperglucemia y el estrés oxidativo además de que están altamente vascularizados (Díaz y Burgos, 2002).

3.4 Complicaciones macrovasculares y la dislipidemia diabética

Entre las principales complicaciones macrovasculares que se presentan en los pacientes diabéticos se encuentran: la enfermedad cardiovascular, que resulta en infarto al miocardio y la enfermedad cerebrovascular, que se manifiesta con ataque cerebral (Andrade-Cetto y Heinrich., 2011). También los diabéticos presentan enfermedades cardiovasculares relacionadas con la aterosclerosis, como insuficiencia cardiaca, insuficiencia cerebral vascular e insuficiencia arterial periférica, dependiendo de la localización del bloqueo de las arterias (Grundy *et al.*, 1999; Noriega-Cisneros *et al.*, 2012).

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias de mediano y grueso calibre, se caracteriza por disfunción endotelial, inflamación vascular, acumulación de lípidos dentro de las paredes de los vasos sanguíneos, lo que conduce a la formación de la placa aterosclerótica, a la remodelación de vasculatura, a la obstrucción luminal crónica o aguda, a anomalías en el flujo sanguíneo y a un aporte de oxígeno comprometido en los tejidos blanco (Olorunnisola *et al.*, 2012).

Es frecuente que los pacientes diabéticos presenten la aparición combinada de hiperglucemia y dislipidemia (Grundy *et al.*, 1999). La dislipidemia diabética engloba un conjunto de anomalías en las lipoproteínas y lípidos potencialmente aterogénicos

(Bloomgarden, 2003). Estas anomalías incluyen niveles elevados de triglicéridos en suero.

3.4.1 Anatomía y funciones del riñón

Los riñones son los órganos más importantes del sistema urinario, son órganos pares con forma de haba, su tamaño depende del volumen corporal de cada persona, aunque en promedio, un riñón puede tener entre 10 y 12 cm de largo, entre 5 y 6 cm de ancho, y aproximadamente 4 cm de grosor. Los riñones en un adulto promedio pesan entre 150 – 170 g y están situados en la parte posterior del abdomen. Hay dos, uno a cada lado de la columna vertebral. El riñón derecho descansa detrás del hígado y el izquierdo debajo del diafragma y adyacente al bazo, separados de estos órganos por el peritoneo parietal posterior (*Figura 2*).

A nivel microscópico, el riñón está formado de 800,000 a 1,000,000 de unidades funcionales, que reciben el nombre de nefronas, que son donde se produce realmente la filtración del plasma sanguíneo y la formación de la orina. En la figura 3 se observan las partes anatómicas del riñón.

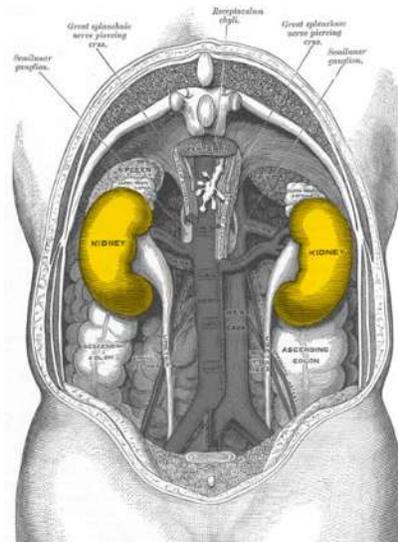


Figura 2. Localización de los riñones en el ser humano.

- 1: Pirámide renal
- 2: Arteria interlobular
- 3: Arteria renal
- 4: Vena renal
- 5: Hilio renal
- 6: Pelvis renal
- 7: Uréter
- 8: Cáliz menor
- 9: Cápsula renal
- 10: Polo renal inferior
- 11: Polo renal superior
- 12: Vena interlobular
- 13: Nefrona
- 14: Cáliz mayor
- 15: Cáliz capital
- 16: Papila renal
- 17: Columna renal

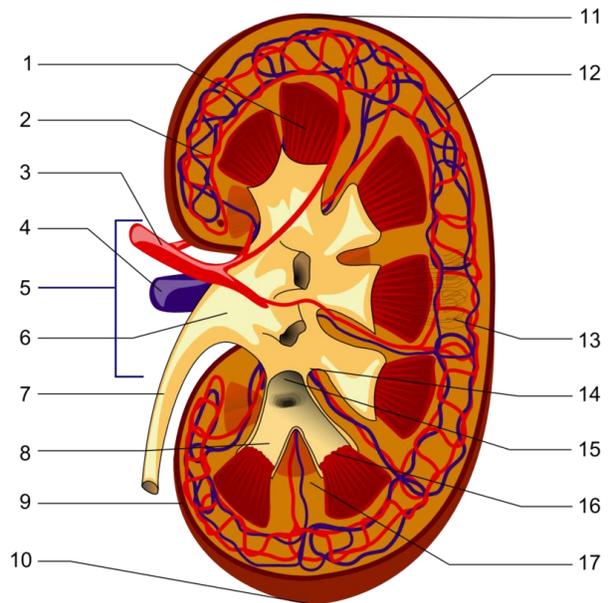


Figura 3. Partes anatómicas del riñón

Los riñones se encuentran altamente vascularizados. Cada riñón recibe su flujo de sangre de la arteria renal, dos de ellas se ramifican de la aorta abdominal. Los riñones realizan el trabajo más importante del sistema urinario, puesto que las otras partes son prácticamente vías de paso y áreas de almacenamiento. Al filtrar la sangre y formar la orina, los riñones contribuyen a la homeostasis de varias maneras. Las funciones renales incluyen: (Krinke, 2000).

-Regulación de la composición iónica de la sangre.
-Mantenimiento de la osmolaridad de la sangre.
-Regulación del volumen sanguíneo.
-Regulación del pH sanguíneo.
-Regulación de la concentración de glucemia.
-Excreción de desechos y sustancias extrañas.

- Regulación de la composición iónica de la sangre: Los riñones ayudan a regular la concentración de distintos iones de la sangre, principalmente los iones sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{+2}), cloruro (Cl^-) y fosfato (HPO_4^-).
- Mantenimiento de la osmolaridad de la sangre: Regulando por separado la pérdida de agua y de solutos de la orina, los riñones mantienen la osmolaridad, es decir, un cierto número de partículas disueltas en la orina, mejorando la homeostasis.
- Regulación del volumen sanguíneo: Al conservar o eliminar agua, los riñones regulan el volumen de sangre y por consiguiente el líquido intersticial.
- Regulación del pH sanguíneo: Los riñones excretan una cantidad variable de H^+ en la orina y retiene iones bicarbonato (HCO^{-3}), un importante amortiguador de H^+ , estos dos iones generan la regulación.
- Regulación de la concentración de la glucemia: Los riñones pueden desaminar el aminoácido glutamina y emplearlo para la glucogénesis (síntesis de nuevas moléculas de glucosa) y liberación de glucosa en sangre.
- Excreción de desechos y sustancias extrañas: Mediante la formación de la orina, los riñones ayudan a eliminar desperdicios de sustancias sin función útil alguna para el cuerpo. Parte de los desperdicios excretados en la orina resultado de reacciones metabólicas, por ejemplo, la urea de la desaminación de aminoácidos, bilirrubina del catabolismo de la hemoglobina, creatinina a partir de creatina de las fibras musculares, ácido úrico del catabolismo de ácidos nucleicos y otras sustancias metabolizadas como son los fármacos y toxinas del medio ambiente (Krinke, 2000).

3.4.2 Pruebas de la función renal

Las pruebas de función renal detectan lesiones renales, la localización anatómica del daño (pre-renal, glomerular o tubular) y cuantifican el grado de daño del órgano. Algunas pruebas van dirigidas a evaluar la función glomerular, a través de la medida de la velocidad de filtración glomerular y otras, dirigidas a evaluar la función tubular. Entre las pruebas que evalúan la función glomerular se encuentran, urea y creatinina en suero, proteinuria cuantitativa y depuración de creatinina (González, 2015).

3.4.2.1 Urea

La urea es un compuesto orgánico y producto final del catabolismo de las proteínas (Prieto y Yuste., 2010). Es una de las sustancias más difusibles en el cuerpo, que en concentraciones elevadas puede ser tóxica, ya que, puede desnaturalizar las proteínas. La urea es transportada en la sangre hacia el riñón donde se filtra el plasma por el glomérulo y la urea es excretada por la orina (González, *et al.*, 2013). La concentración de urea en sangre (uremia) aumenta como consecuencia de dietas con exceso de proteínas, ejercicio, insuficiencia cardiaca, obstrucciones renales, así como también por fármacos o tóxicos que propician la destrucción de las proteínas. Una concentración alta de uremia se le conoce como “azoemia” y si es acompañada con insuficiencia renal, se le llama síndrome urémico (González *et al.*, 2013).

3.4.2.2 Creatinina

La creatinina es el producto resultante del catabolismo de la fosfocreatina en el tejido muscular, estando en el torrente sanguíneo se elimina casi en su totalidad por el riñón. Sin embargo, no sufre reabsorción tubular, por lo que a diferencia de la urea, las concentraciones séricas de creatinina guardan estrecha relación con el volumen del filtrado glomerular o por una drástica modificación muscular. Igualmente, su valor es menos dependiente de la dieta y no se modifica con las variaciones del metabolismo proteico. El aumento de la creatinina responde a las mismas causas que la elevación de las cifras de urea, donde la insuficiencia renal es la principal razón del aumento de los niveles en suero (Prieto y Yuste., 2010).

3.4.2.3 Complicaciones microvasculares y la nefropatía diabética

Entre las complicaciones microvasculares más frecuentes que se presentan en los diabéticos se encuentran: la nefropatía, retinopatía y neuropatía periférica con desenlace en amputaciones (Andrade-Cetto y Heinrich., 2011), de las cuales, la nefropatía diabética es una de las complicaciones microvasculares más severas y la principal causa de falla renal terminal. Se caracteriza por el desarrollo de proteinuria con disminución de la tasa

de filtración glomerular y evoluciona durante un largo periodo de tiempo (10 – 20 años) (Andrade-Cetto y Heinrich, 2011). El desarrollo y la progresión de la nefropatía es altamente compleja dada la diversidad de poblaciones celulares presentes en el riñón y las diferentes funciones fisiológicas de este órgano. Las alteraciones hemodinámicas, como el aumento en la tasa de filtración glomerular debido al incremento de flujo de plasma y la presión capilar glomerular (O'Bryan, 1997), así como la hiperplasia e hipertrofia, son eventos que aparecen en etapas tempranas de la nefropatía (Rash, 1983). La nefropatía diabética ocupa un lugar importante en la elevada generación de ERO causada por la hiperglucemia y el consecuente estrés oxidativo (Kim, 2012).

La elevada concentración de glucosa en el espacio extracelular define el estado diabético, pero la tasa del metabolismo de la glucosa intracelular dicta el desarrollo de la nefropatía diabética. Las células renales no requieren de insulina para la captación de glucosa, pues poseen transportadores transmembranales que translocan la glucosa a través de la membrana celular mediante transporte facilitado. Entre las isoformas de GLUT, las más ampliamente expresadas en el riñón son GLUT-1 y GLUT-2. La nefropatía diabética no es solamente la causa principal de la enfermedad renal terminal, sino que es una de las principales complicaciones de la diabetes de larga evolución (Díaz y Burgos, 2002).

3.4.3 Anatomía del cerebro

El cerebro comprende la porción anterior y superior del encéfalo. Tiene forma ovoide con su extremidad más gruesa hacia atrás. Mide 17 cm. en sentido anteroposterior, 14 cm en sentido transversal y 12 cm en sentido vertical; en la mujer las dimensiones varían medio centímetro. Pesa aproximadamente 1,200 g en el hombre y 1,100 g en la mujer. Tiene alrededor de 100 mil millones de neuronas (Quiroz, 1997; Guyton, 2012). En conjunto, está constituido por dos mitades simétricas, denominadas hemisferios cerebrales (derecho e izquierdo), separadas una de otra por una cisura muy profunda, sagital y mediana, la cisura interhemisférica. La cara externa de cada hemisferio

se divide en cuatro lóbulos: frontal, occipital, temporal y parietal. La superficie del cerebro tiene un gran número de surcos (Quiroz, 1997) (Figura 4).

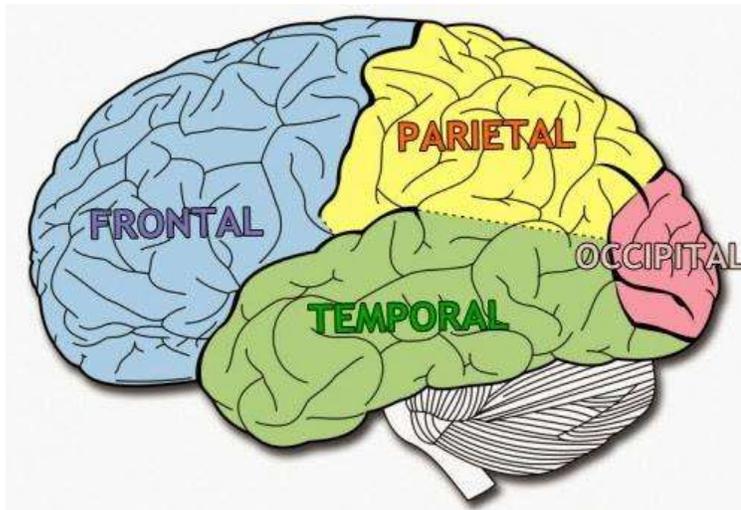


Figura 4. Lóbulos cerebrales (vista lateral).

3.4.3.1 Diabetes y neuropatías

La diabetes se ha relacionado con el desarrollo gradual del daño en órganos en el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) (Mastrocola, 2005). Cada vez se ha hecho más claro que el cerebro es otro sitio blanco de daño durante la diabetes (Manschot, 2006). Esta complicación referida como encefalopatía diabética, está caracterizada por el deterioro de las funciones cognitivas y cambios electrofisiológicos. Estos cambios funcionales son acompañados por anomalías estructurales y neuroquímicas, así como por cambios degenerativos en el cerebro (Mastrocola, 2005). Se han reportado déficits cognitivos, los cuales son generalmente modestos en pacientes adultos jóvenes (Biessels, 1994), pero pueden ser más pronunciados en pacientes diabéticos de mayor edad (Steward, 1999). Estudios neurofisiológicos en pacientes con DM 2 demostraron un moderado deterioro en la función cognitiva, implicando particularmente la memoria verbal o el procesamiento de información compleja (Reske-Nielsen, 1965; Musen, 2006). Otros estudios han registrado efectos de disminución en la

densidad de materia gris en el cerebro, en regiones responsables del procesamiento del lenguaje y la memoria (Musen, 2006; Wessels, 2006). La patogénesis de la encefalopatía diabética es probablemente un proceso multifactorial en el que participan tanto factores vasculares como metabólicos. Se ha hecho referencia de que las enfermedades cerebrales micro y macrovasculares presentes en los pacientes diabéticos y el daño neuronal directo causado por concentraciones crónicamente elevadas de glucosa están implicadas en la encefalopatía (Mastrocola, 2005). Los efectos a largo plazo de la diabetes sobre el cerebro se presentan a nivel estructural, neurofisiológico y neuropsicológico. La visión que emerge, es que el cerebro diabético presenta muchos síntomas que son mejor descritos como un “envejecimiento acelerado del cerebro” (Biessels, 2002). Existen reportes que sugieren que la toxicidad directa de la glucosa en las neuronas es debida a una incrementada oxidación de la glucosa (hiperglucemia), la cual conduce a un incremento en la producción de las ERO tanto en humanos y en ratas diabéticas experimentalmente, por lo que el estrés oxidativo (EO) parece jugar un papel central en el daño cerebral (Mastrocola, 2005).

3.4.3.2 Metabolismo de la glucosa en el cerebro

En condiciones normales, casi toda la energía utilizada por las células del cerebro es suministrada por la glucosa procedente de la sangre. Al igual que el oxígeno, la mayor parte de ésta es suministrada por la sangre capilar y en un momento dado, sólo existe un almacén de glucosa para dos minutos en forma de glucógeno en las neuronas (Guyton, 2012). Una característica especial del suministro de glucosa a las neuronas es que su transporte al interior de éstas a través de la membrana celular no depende de la insulina, siendo necesaria esta hormona en la mayor parte de las células restantes del cuerpo. Incluso en pacientes que tienen una diabetes grave con una secreción prácticamente nula de insulina, la glucosa todavía difunde con facilidad al interior de las neuronas (Guyton, 2012).

El cerebro es el más exigente de los órganos metabólicamente hablando, por lo que debe generar ATP en grandes cantidades para mantener los potenciales de

membrana que son esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos (Mathews, 2001). Además de depender del constante suministro de glucosa, también depende de la concentración de glucemia, el mantenimiento de ésta es crucial para el funcionamiento del cerebro (Lehninger, 1995).

Los requerimientos energéticos del cerebro ascienden alrededor del 60% de la utilización de glucosa del ser humano en reposo y necesita 120 g de glucosa al día. El cerebro es un órgano altamente aerobio y su metabolismo requiere alrededor del 20% del oxígeno total consumido por el ser humano (Mathews, 2001).

La glucosa es utilizada por el cerebro exclusivamente por la vía glucolítica (*Figura 5*) y por el ciclo de Krebs (*Figura 6*) (Lehninger, 1995; Pelley, 2008). Para que la glucosa pueda ser metabolizada debe entrar a la célula a través de los transportadores GLUT presentes en la membrana celular. Una vez que la glucosa entra a la célula es fosforilada e ingresa a la vía glucolítica, el producto final es el piruvato, que se oxida a CO_2 y H_2O en el ciclo de Krebs dentro de la mitocondria.

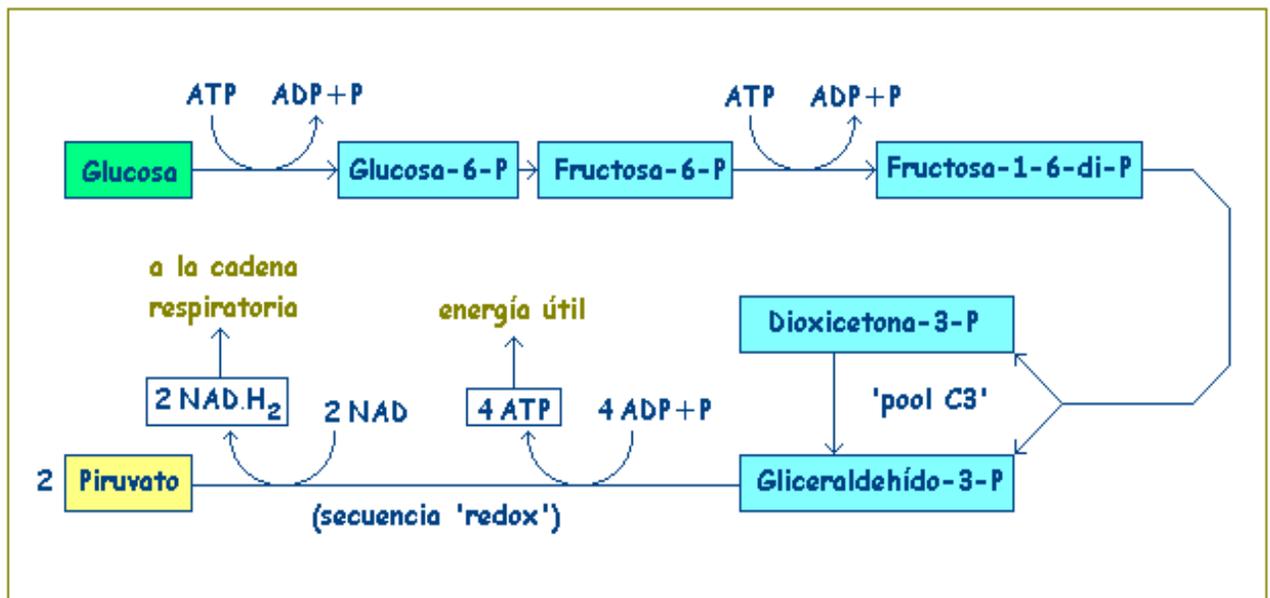


Figura 5. Esquema de la vía glucolítica. La glucólisis es la ruta metabólica encargada de la oxidación de la glucosa para obtener energía. Se comprende de 9 reacciones, cada una catalizada por una catalizada por una enzima específica hasta formar dos moléculas de

ácido pirúvico. La ganancia neta es de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. La glucólisis forma parte de la respiración celular aerobia (Figura 7).

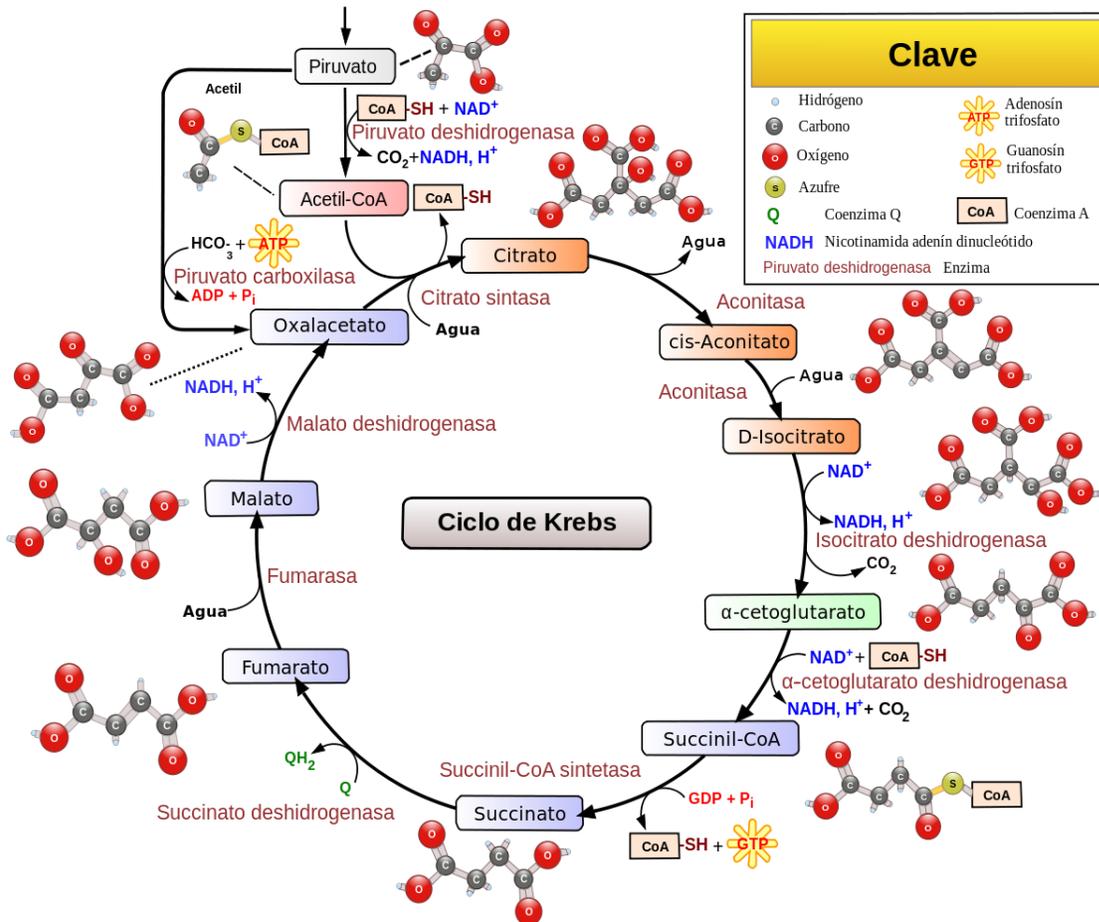


Figura 6. Ciclo de Krebs. Es una ruta metabólica que forma parte de la respiración celular (Figura 7). En células eucariotas se realiza en la mitocondria, en las procariontas en el citoplasma. El catabolismo glucídico y lipídico (a través de la glucólisis y la β -oxidación), produce acetil-CoA, un grupo acetilo enlazado a la coenzima A. El acetil-CoA constituye el principal sustrato del ciclo. Su entrada consiste en una condensación con oxalacetato, al generar citrato. Al término del ciclo mismo, los dos átomos de carbono introducidos por el acetil-CoA serán oxidados en dos moléculas de CO_2 , regenerando de nuevo oxalacetato capaz de condensar con acetil-CoA. La producción relevante desde el punto de vista energético, sin embargo, se produce a partir de una molécula de GTP (utilizada inmediatamente para regenerar una molécula de ATP), de tres moléculas de NADH y una de FADH_2 . Los cofactores reducidos, NADH y FADH_2 , se comportan como intermediarios óxido/reductores. Cuando están reducidos, son capaces de transportar electrones a energía relativamente alta (por ejemplo sustraída a los sustratos oxidados en la glucólisis o en el mismo ciclo de Krebs), hasta la cadena respiratoria mitocondrial. Cerca de tal cadena se reoxidan a NAD^+ y a FAD y ceden los electrones a la cadena misma, que será así capaz de regenerar moléculas de ADP y ATP.

<http://www.monografias.com/trabajos92/ciclo-krebs/ciclokrebs.shtml#ixzz4tvvbOWNa>.

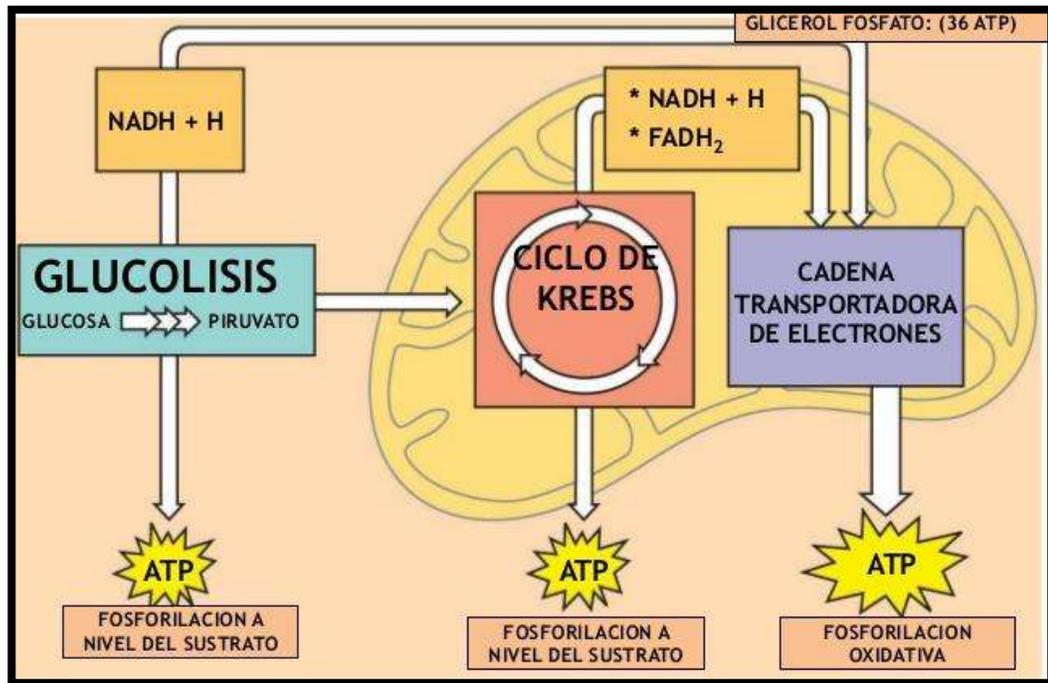


Figura 7. Respiración celular.

3.5 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos celulares de forma globular, poseen un diámetro de 0.5 - 1 μm y miden alrededor de 7 μm de longitud, se encuentran en todas las células excepto las bacterias y los eritrocitos maduros del organismo multicelular, su número en las células de nuestro cuerpo varía de acuerdo a la cantidad de trabajo que la célula lleva a cabo (Devlin, 2006). En el caso de las nefronas, la cantidad de mitocondrias es elevada, principalmente en el tubo proximal debido al gran requerimiento energético (Loewy y Siekevits, 1983). Ya que las mitocondrias son las estructuras celulares encargadas de producir la mayor parte de la energía celular en forma de ATP, también son los principales orgánulos que producen ERO.

La mitocondria contiene una membrana externa y otra funcionalmente más compleja, la membrana interna, el espacio comprendido entre éstas, es el espacio intermembranal. La membrana externa esta conformada por cerca del 40 % de lípidos y

60 % de proteínas. La membrana interna consiste de 80 % de proteínas y es rica en ácidos grasos insaturados. Los complejos enzimáticos del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa están localizados en esta membrana. La membrana interna aparece invaginada en pliegues o crestas, lo cual incrementa su área, la mitocondria presenta ADN bicatenario propio y circular (*Figura 8*) (Devlin, 2006).

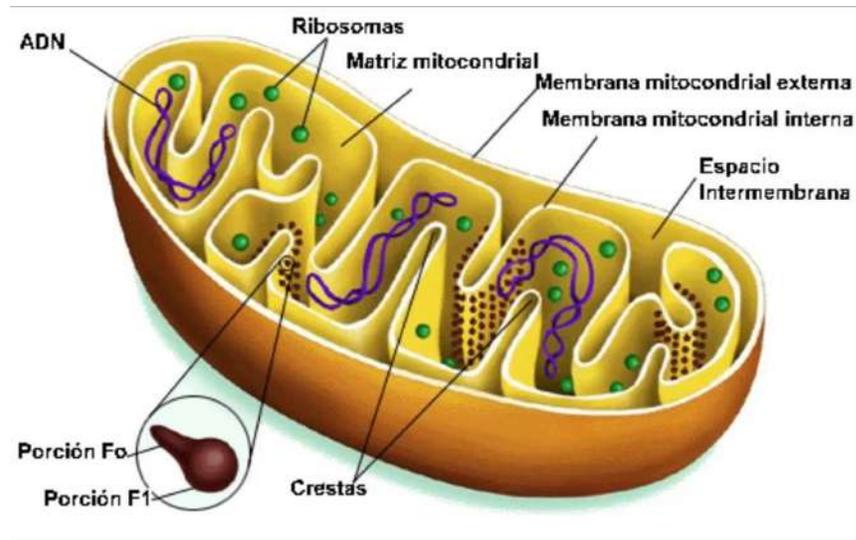


Figura 8. Esquema de la estructura de la mitocondria.

Las secuencias metabólicas llevadas a cabo dentro de la mitocondria son: el ciclo de Krebs (*Figura 6*), el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (*Figura 9*), la oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos, entre otras (Lehninger, 1995).

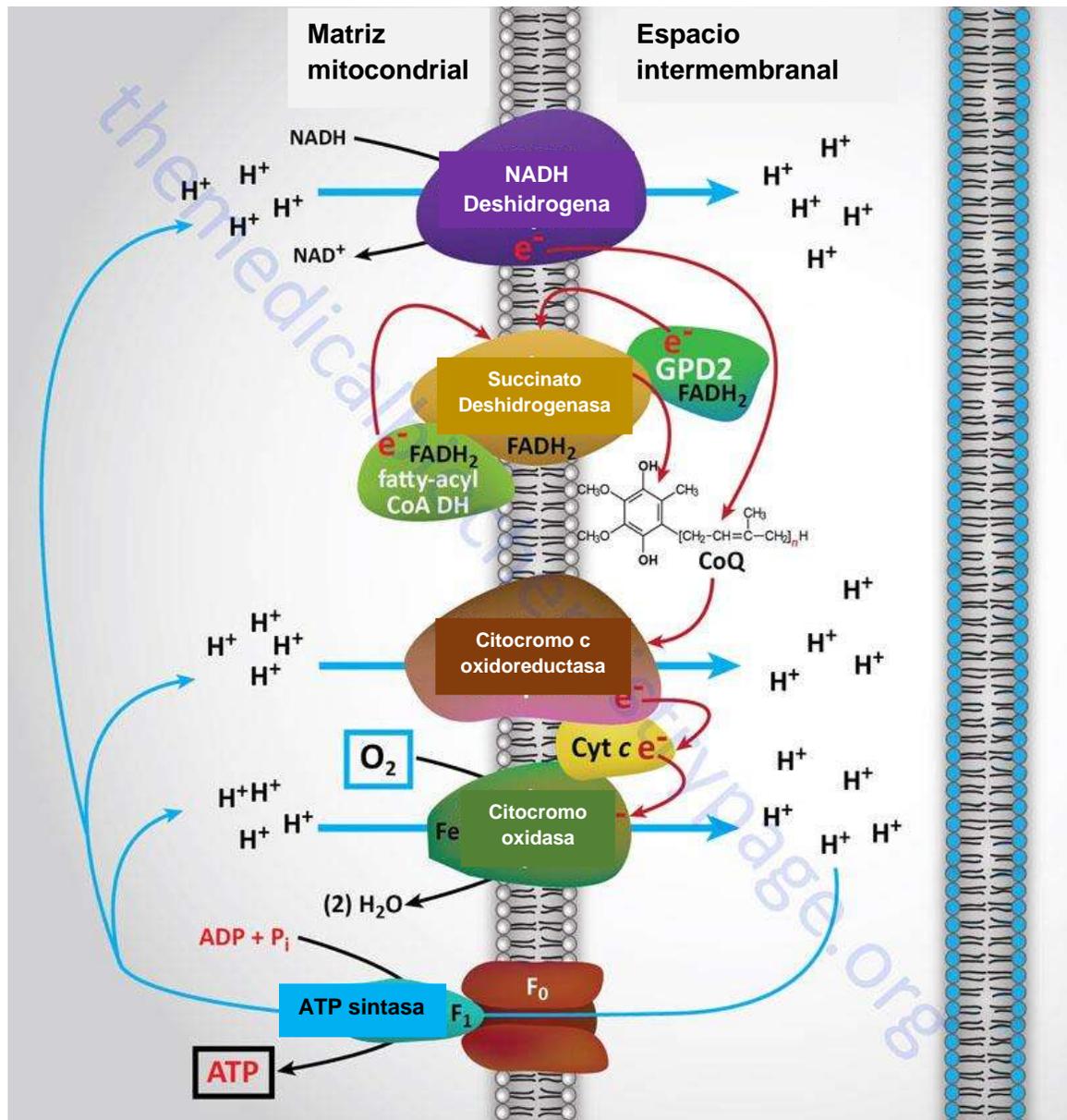


Figura 9. Fosforilación oxidativa.

El efecto dañino de las ERO puede ser el responsable del deterioro mitocondrial observado en el estrés oxidativo y especialmente en procesos de envejecimiento celular (Delaval, 2004). Existen evidencias que demuestran que el estrés oxidativo y el consecuente daño oxidativo observado en condiciones de hiperglucemia comienza en la mitocondria, por ser la principal fuente productora de ERO (Raha, 2000; Duchon, 2004; Rolo, 2006).

3.5.1 Hiperglucemia y el mal funcionamiento de la mitocondria

Las mitocondrias fallan durante la diabetes debido principalmente a la hiperglucemia. El exceso de glucosa sobrecarga a las mitocondrias con una vasta cantidad de equivalentes reductores (NADPH y FADH₂), sobrepasando su capacidad para transportar los electrones, ya que son transportados de manera defectuosa por la CTE en la mitocondria, lo que da lugar a su reacción descontrolada con el oxígeno para generar RL, mimos que son generados en el metabolismo; pero durante la diabetes, se forman de manera excesiva, sobrepasando los mecanismos de defensa antioxidante de las células. Además de que estos ocasionan daño en los lípidos, el material genético y las proteínas de las células, los radicales libres sirven como “señales químicas” que activan mecanismos que hace que órganos como el riñón o el hígado produzcan proteínas (como queratinas, colágeno, elastina) que los vuelven “fibrosos” y rígidos. Así, el riñón, el hígado y otros órganos, pierden su función y se producen las complicaciones de la diabetes.

3.6 Estrés oxidativo (EO)

El estrés oxidativo describe un estado de daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Se produce por el desbalance entre los antioxidantes y las ERO cuando son sobreproducidas estas últimas y los sistemas antioxidantes no son capaces de neutralizarlas. Las ERO son un tipo de moléculas que derivan del metabolismo del oxígeno y existen en todos los organismos aeróbicos. La mayoría son de origen endógeno y son subproductos de reacciones normales y esenciales, como la generación de energía mitocondrial (Castillo *et al.*, 2003).

3.6.1 Especies reactivas de oxígeno y sus características

Aunque generalmente las reacciones de oxidación aseguran que el oxígeno molecular sea reducido completamente a agua, los productos de la reducción parcial del oxígeno son altamente reactivos. Estos productos son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO). Algunos compuestos generados a través del oxígeno son considerados radicales libres (RL) que son moléculas con un electrón desapareado y

altamente reactivos, sin embargo, producen estrés oxidativo (EO). Los compuestos derivados del oxígeno son:

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

Las ERO tienen un bajo peso molecular, son extremadamente reactivas, se forman como consecuencia de reducciones univalentes subsecuentes del oxígeno; presentan una vida media muy corta, ocasionan una reacción en cadena y pueden reaccionar con macromoléculas orgánicas, modificando su estructura y función, por lo que son potencialmente citotóxicos (Venereo, 2002).

El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es un radical cargado negativamente, formado como consecuencia de la reducción del oxígeno molecular.



Son variados los sistemas enzimáticos y no enzimáticos en donde se produce este radical, siendo la mitocondria el principal productor, ya que en la cadena transportadora de electrones (CTE) del 2 al 4 % del oxígeno consumido es reducido parcialmente por los electrones provenientes de dicha cadena (Green *et al.*, 2004). Así, los principales sitios productores del radical superóxido son los complejos I y III de la CTE. El $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos tales como quinonas, metales de transición, ascorbato, α -tocoferol, catecolaminas, tioles (Cortes *et al.*, 2004).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un metabolito del oxígeno formado por la dismutación del O_2^- catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno no es un radical libre puesto que no posee ningún electrón desapareado, pero se incluye dentro del término “ERO” por su alta reactividad en presencia de metales de transición generando un potente oxidante (Fridovich. 1995).

El radical hidroxilo (OH^\cdot) es el más reactivo entre las especies conocidas, capaz de reaccionar, de modo directo con casi cualquier molécula biológica, las reacciones ocurren a una velocidad muy elevada (Fridovich. 1995). El mecanismo de producción del OH^\cdot es principalmente por la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales de transición, principalmente el ión ferroso (Fe^{2+}) y cúprico (Cu^{2+}), por la reacción de Fenton (Minotti *et al.*, 1987). El radical hidroxilo es el principal responsable del daño a los lípidos de membrana, generando así la lipoperoxidación, una de las principales consecuencias del estrés oxidativo.

Reacción de Fenton



3.6.2 Cadena transportadora de electrones (CTE) y síntesis de RL y ERO

La CTE está compuesta por proteínas transmembranales en la membrana interna mitocondrial, estas proteínas son complejos enzimáticos (I-IV). El transporte electrónico se da secuencialmente a través del complejo I (NADH Deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), la ubiquinona, citocromo reductasa (complejo III) para llegar finalmente al citocromo c oxidasa (complejo IV), que los cederá al oxígeno molecular, generando H_2O . De forma alternativa, los electrones del FADH_2 , producto final del complejo II, pasan a la ubiquinona y son canalizados mediante el complejo III, citocromo c y complejo IV para que lleguen finalmente hasta la reducción del oxígeno molecular (O_2). Este transporte de electrones no es del todo eficiente y a veces el oxígeno es reducido antes de llegar al complejo IV, dando lugar a las ERO (Murphy, 2009).

En los complejos I, III y IV de la CTE, se produce un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, que genera un gradiente electroquímico (de pH) o potencial de membrana que es aprovechado por la ATPasa para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, completándose de este modo el proceso de fosforilación oxidativa (Mitchell, 1961). El ATP generado en este proceso, es utilizado en los distintos tejidos para mantener las necesidades energéticas celulares. Así, aquellos tejidos que tengan mayor requerimiento de ATP serán los más afectados en el caso de producirse fallos en su generación.

Los RL se producen constantemente durante la oxidación de los alimentos. Algunas enzimas como la xantina oxidasa y aldehído oxidasa forman el radical de anión superóxido o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La NADPH oxidasa en las células inflamatorias (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos), producen el anión superóxido por un proceso de estallido respiratorio durante la fagocitosis. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno y después en ácido hipocloroso (HClO) con la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y la mieloperoxidasa (MPO). El superóxido y los iones hipoclorosos, son los efectores finales de la acción bactericida. Esta es una producción deliberada de los RL en el cuerpo (Vasudevan *et al.*, 2011).

Entre los factores que contribuyen a generar estrés oxidativo están: Tabaquismo, depresión, radiación, alcohol, ansiedad, sedentarismo y la diabetes.

Los RL se generan a nivel intracelular y extracelular y provienen de fuentes enzimáticas y no enzimáticas (Rodríguez *et al.*, 2001; Hicks *et al.*, 2006).

Tabla 3. Formación de radicales libres a través de fuentes enzimáticas y no enzimáticas (López *et al.*, 2001).

Enzimáticas	
Mitocondria	Cadena transportadora de electrones (CTE).
Enzimas oxidantes	Xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofanodioxigenasa, la mieloperoxidasa y la NADPH oxidasa.
Retículo endoplásmico	Sistemas transportadores de electrones.
Peroxisomas	Orgánulos del citosol muy ricos en oxidasas y que constituyen una importante fuente de H ₂ O ₂ .
No enzimáticas	Autoxidación de flavinas reducidas, tioles y pequeñas moléculas como hidroxiquinonas, catecolaminas y tetrahidropterinas.

El incremento anormal de los RL puede provocar alteraciones en los componentes celulares y dañar su función, apareciendo entonces ante esto diferentes respuestas celulares patológicas, las cuales dependerán del tipo y cantidad de RL implicados, de la composición bioquímica de las células y, de manera especial, de la capacidad de éstas para contrarrestar la acción de estos elementos agresores, lo cual ocurre a través de variados mecanismos, que en conjunto se conocen como el “Sistema de defensa antioxidante”.

3.7 Defensas antioxidantes mitocondriales

Entre las defensas antioxidantes con las que cuenta la mitocondria se encuentran la superóxido dismutasa 2 dependiente de manganeso (MnSOD) que convierte el superóxido a peróxido de hidrógeno, la glutatión peroxidasa que descompone el H₂O₂ en agua, la glutatión reductasa mantiene en estado reducido la reserva de glutatión mitocondrial, esta enzima requiere NADPH producido en la mitocondria por la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ y a través de una transhidrogenasa dependiente del $\Delta\mu\text{H}^+$. El daño oxidativo ocurre siempre y cuando las especies reactivas producidas por la mitocondria evaden la detoxificación y el nivel en estado constante del daño oxidativo

depende de las velocidades relativas de acumulación de daño, reparación y degradación (Green *et al.*, 2004).

3.8 Antioxidante y tipos

Un antioxidante es una sustancia que puede estar presente en bajas concentraciones respecto de las de un sustrato oxidable (biomolécula) que retarda o previene la oxidación de éste sustrato. El antioxidante al interactuar con el RL cede un electrón (se oxida), así que los antioxidantes impiden que las moléculas se unan a los RL. Con su acción que realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos, sacrifican su propia integridad molecular con el objetivo de evitar el estrés oxidativo (Venereo, 2002).

3.8.1 Antioxidantes endógenos (Enzimas antioxidantes)

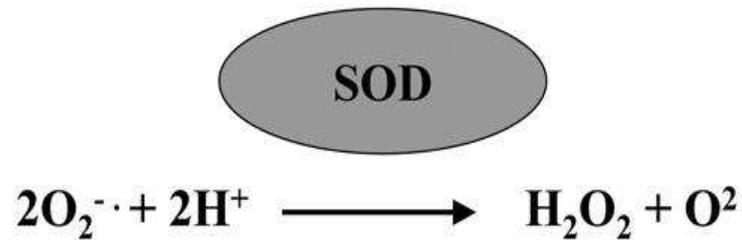
— Enzimas vinculadas directamente:

3.8.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

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

La SOD protege a la célula de las reacciones dañinas del superóxido. El superóxido ($O_2^{\cdot-}$) espontáneamente dismuta a O_2 y H_2O_2 de forma bastante rápida ($\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$ a pH 7). La

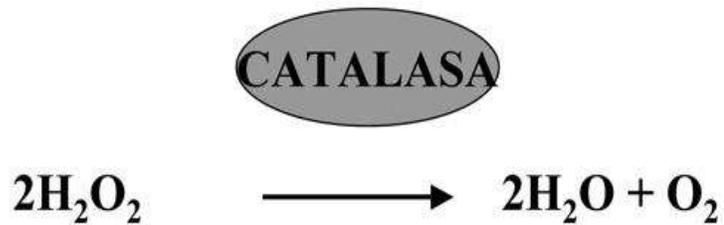
SOD es biológicamente necesaria porque el superóxido reacciona aún más rápido con algunos blancos como el óxido nítrico (NO·), para formar peroxinitrito (ONOO·).



Reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa.

3.8.1.2 Catalasa (CAT)

La CAT es una enzima tetramérica, con amplia distribución en el organismo. Su presencia es abundante en el hígado y el riñón. La CAT contiene moléculas de NADPH y se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad al sustrato. Tiene dos funciones, una catalítica y una peroxidativa. En la reacción catalítica utiliza como donadores a otras moléculas de H₂O₂. En la reacción peroxidativa, la enzima utiliza como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído. Una molécula de CAT es capaz de catalizar la transformación de alrededor de 1x10⁷ moléculas de sustrato/segundo, la primera reacción tanto del mecanismo catalítico como peroxidativo es la heterólisis o rompimiento de los enlaces oxígeno-oxígeno en la reacción catalítica se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno y forma agua (Peraza-Reyes, 2008).



Reacción catalizada por la enzima catalasa.

3.8.1.3 Glutación reductasa (GSH-Rd)

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



3.8.1.4 Glutación peroxidasa (GPx)

Esta es una enzima seleno-dependiente de localización mitocondrial, citosólica y lisosómica, que cataliza la reducción del H_2O_2 a radical hidroperóxido en presencia de glutación reducido y selenio; la figura 12 muestra la reacción catalizada por ésta enzima. El ciclo redox del glutación es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo. La actividad de esta enzima contribuye a proteger a los lípidos de la membrana

celular de la lipoperoxidación. La capacidad reductora de la GP_x se basa en altas concentraciones de glutatión reducido (GSH); un tripéptido celular con un grupo sulfhidrilo, con capacidad antioxidante. Durante el mecanismo catalítico de la GP_x, el GSSG formado durante la reacción es reducido por la enzima glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2008). Un ejemplo de cómo actúan estas enzimas se muestra en la figura 10.

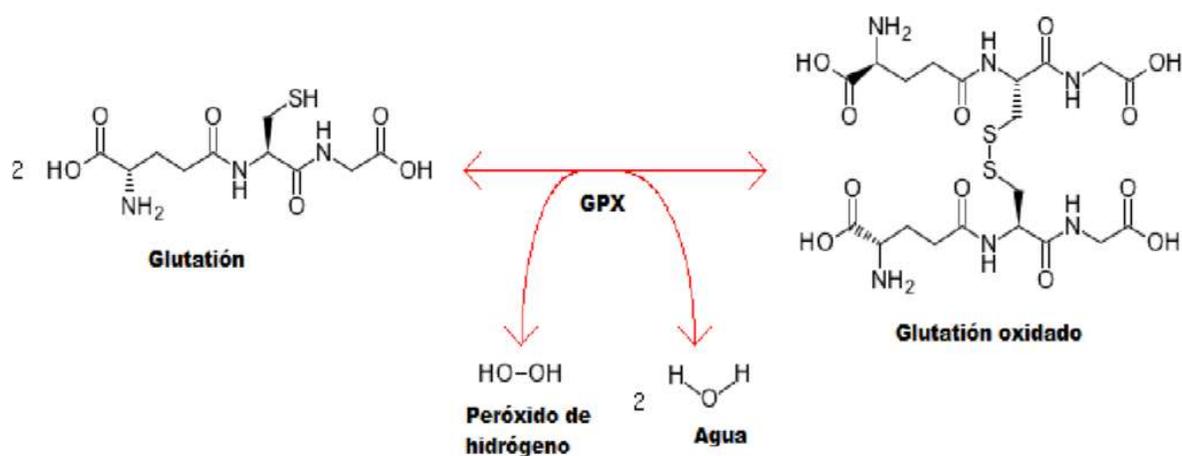


Figura 10. Reacción de la glutatión peroxidasa (GPx), en esta reacción se utiliza glutatión como donador de electrones para convertir el H₂O₂ en 2 moléculas de agua. ([www.genome.jp/KEGG/.](http://www.genome.jp/KEGG/))

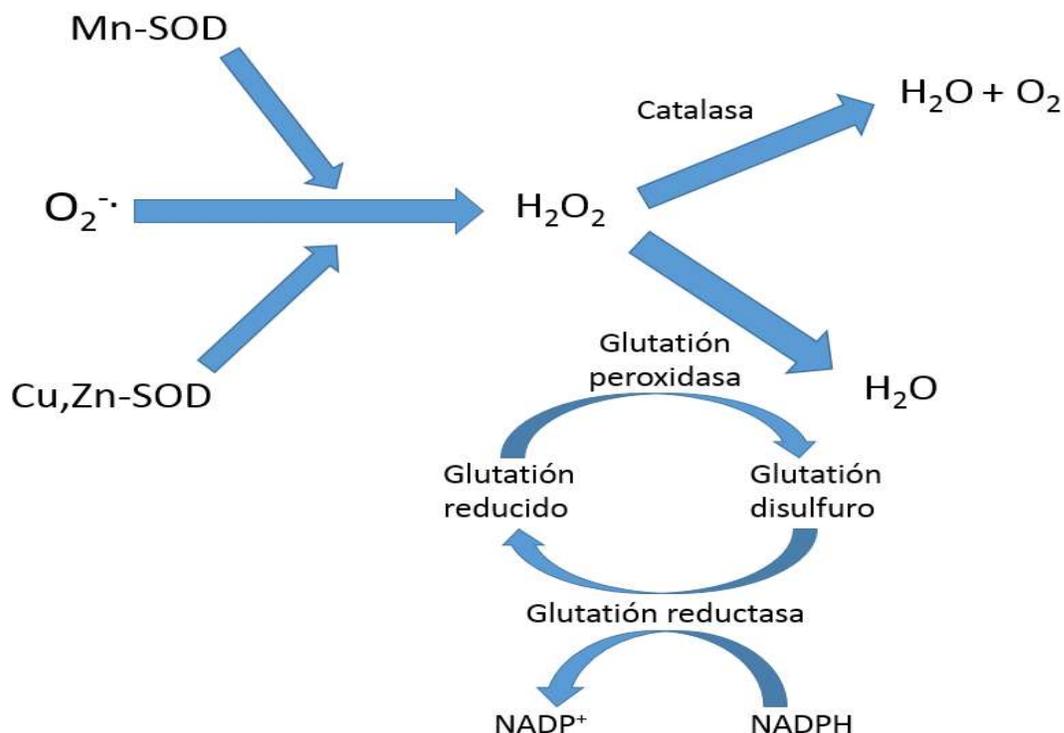


Figura 11. Esquema general de la reducción del anión radical superóxido a través de los sistemas enzimáticos antioxidantes endógenos.

3.8.2 Antioxidantes no enzimáticos y exógenos

3.8.2.1 Glutatión (GSH)

El glutatión es un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (Figura 12) y tiene un peso molecular de 307 Daltones. El GSH es un tiol, cuya gran capacidad neutralizadora de RL radica en el grupo sulfhídrico de la cisteína. El GSSG es reducido enzimáticamente a GSH por la glutatión reductasa haciendo que el NADPH se oxide a NADP. Son especies químicas cuya propiedad antioxidante reside en su capacidad para destruir directamente los RL. Reduce el H_2O_2 a agua, en presencia de la GPx, transformándose en glutatión oxidado (GSSG). El glutatión es capaz de ejercer su papel protector sólo cuando se presenta en su forma reducida (GSH). La forma oxidada del

glutación se presenta cuando dos moléculas de GSH se oxidan (por presencia de agentes oxidantes o por autooxidación) cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar a la forma disulfuro (GSSG).

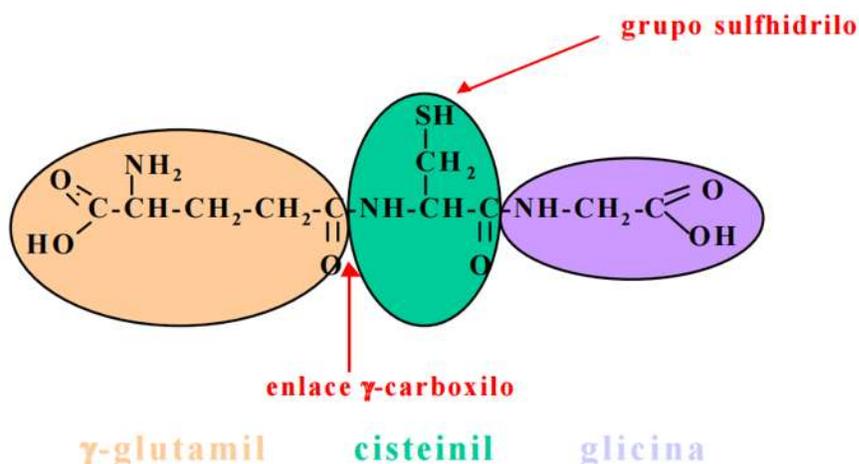


Figura 12. Estructura del glutatión.

Puede presentarse tanto en forma de tiol reducido (GSH), como de disulfuro oxidado (GSSG) y la relación GSH/GSSG es fundamental para mantener el estado redox celular. El GSH es el tiol endógeno no proteico más abundante y el principal antioxidante intracelular, actúa como atrapador de RL y como reductor del H_2O_2 . La suma de las formas tiol reducido más disulfuro oxidado, se le conoce como glutatión total (GSH_T) (Matuz-Mares *et al.*, 2005). La oxidación del glutatión conduce a la formación de glutatión disulfuro (GSSG). El estado intracelular de GSH parece ser un indicador sensible de la salud de la célula completa y de su habilidad para resistir a cambios tóxicos o dañinos. El glutatión se encuentra en todos los órganos, pero donde se presenta en mayor cantidad es en el hígado, el cual actúa como centro de síntesis, almacenamiento y distribución de dicho tiol para su utilización por los otros tejidos y órganos periféricos, incluyendo el cerebro (Matuz-Mares *et al.*, 2005; Dringen, 2000).

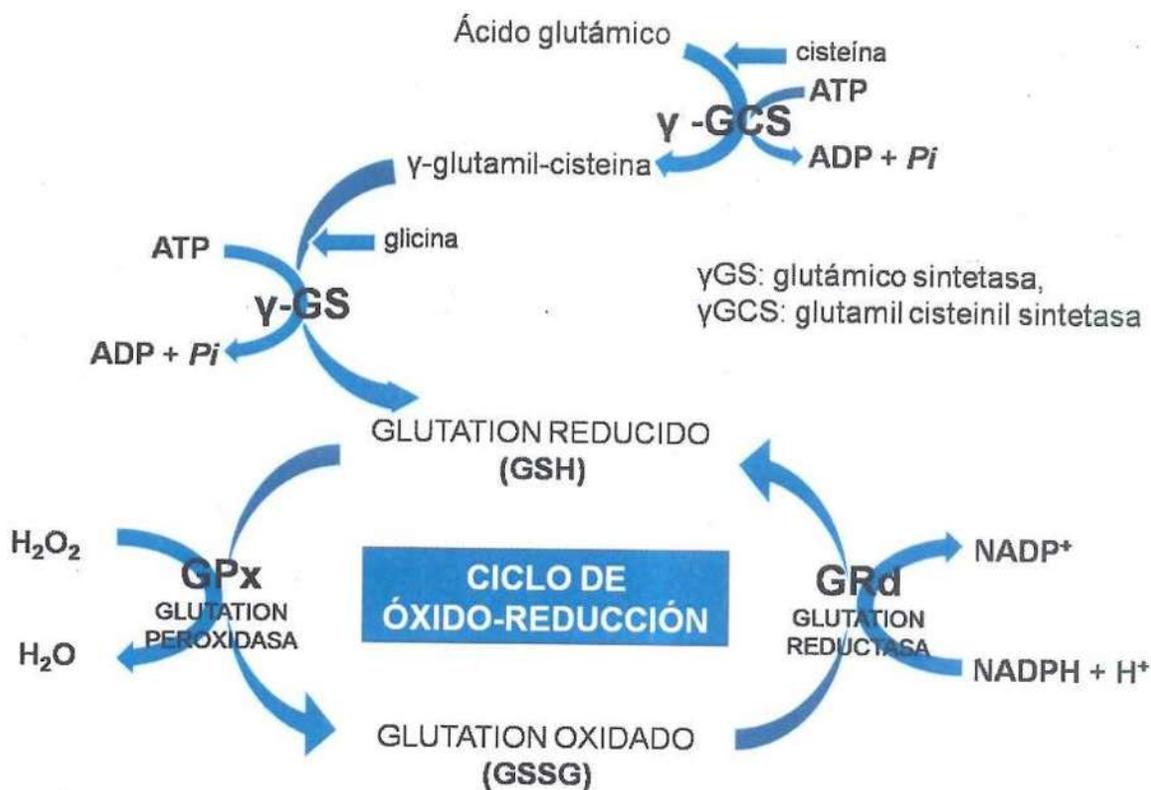


Figura 13. Síntesis y ciclo redox del glutatión. La síntesis ocurre en 2 etapas y depende de la disponibilidad de sustratos y de los mecanismos regulatorios. El paso de regulación en la síntesis ocurre a nivel de la enzima gamma glutamil cisteinil sintetasa. El GSH se oxida a glutatión oxidado (GSSG) por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa y el GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio de la enzima glutatión reductasa, la cual requiere NADPH como cofactor. Tomado de Pérez-Gallardo R. 2009.

3.8.2.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy amplio de compuestos antioxidantes polifenólicos, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son pigmentos naturales que protegen a las plantas del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta. Algunas de sus funciones son: defensa, señal química y efecto sobre enzimas (Cartaya, 2001). Son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas actuando como atrayentes de animales en la

ovoposición, participan en la defensa de las plantas frente a agentes agresores externos como: Bacterias, hongos e insectos y otros animales herbívoros; además, presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante que son capaces de suprimir la formación de RL (Hertog *et al.*, 1997).

3.8.2.3 Las plantas como antioxidantes naturales

Las plantas son una de las fuentes más prometedoras para descubrir nuevos agentes antioxidantes (Martin y Ernst, 2003; Ziech *et al.*, 2012). La historia de la medicina tradicional demuestra el potencial de las plantas como fuente de compuestos bioactivos (Kaewpibonn *et al.*, 2012). Entre los compuestos presentes en las plantas con mayor actividad antioxidante reportada se encuentran: polifenoles (taninos, flavonoides, derivados del ácido cinámico, xantonas, cumarinas, lignanos, quinonas, rotenoides, estilbenos), aceites esenciales (terpenoides y aromáticos), ácidos grasos (saturados e insaturados), algunos alcaloides (derivados de la isoquinoleína) y otros compuestos como los carotenos, los ácidos benzoicos y ascórbico, tocoferoles, el sitosterol y elementos minerales (Bhaskar y Balakrishnan, 2009; Ebrahimzadeh *et al.*, 2009). Estas sustancias sirven a la planta como mecanismo de defensa ante el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros (Dixon, 2001). Los terpenoides dan a la planta su olor característico y en algunos casos, su sabor; otros, como las quinonas y los taninos son los responsables de la pigmentación (Dixon, 2001).

En México, la mayor parte del conocimiento tradicional que se tiene acerca de las plantas medicinales proviene desde la época prehispánica y actualmente diversos grupos étnicos lo conservan, ya que los seres humanos han utilizado semillas, raíces, tallos, flores y frutos de las plantas para la alimentación y aliviar los trastornos, debido a la eficacia de su curación, disponibilidad y bajo costo. Desde hace más de 30 años ha surgido la necesidad de integrar la medicina tradicional dentro de los sistemas oficiales para mejorar la calidad de vida de los pacientes, esto por razones de orden cultural y económico. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 4,000 y 5,000 plantas con potencial terapéutico. Un total de 3,000 especies han sido compiladas en un atlas de plantas

medicinales empleadas por diversos grupos étnicos. Increíblemente, solo el 1% de las plantas medicinales han sido estudiadas a fondo en sus propiedades curativas. Por lo tanto, es claro que debe realizarse una mayor investigación clínica y etnobotánica, en virtud de elucidar el posible beneficio medicinal de estas plantas (Lozoya, 1994).

El interés científico por el uso de plantas dirigido a la búsqueda de fitoterapéuticos para el tratamiento de la DM, ha llevado a la realización de investigaciones que validan el uso de plantas medicinales y han encontrado nuevos compuestos con estas propiedades. En México, en diversas instituciones educativas y de investigación reportan un gran número de plantas ampliamente utilizadas en la medicina tradicional y con un alto potencial para ser utilizadas en los tratamientos de la DM. Los efectos terapéuticos de las plantas se deben al contenido de diferentes metabolitos secundarios como los aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenlactonas, cetonas y flavonoides, entre otros (Huerta, 1997).

El uso de plantas medicinales es una práctica común entre los diabéticos mexicanos para el tratamiento empírico de la DM (Argaez-Lopez *et al.*, 2003). En la actualidad se buscan y ensayan diversas estrategias médicas, mediante una combinación de la dieta, educación, ejercicio físico, inmunoterapia, incluso trasplantes pancreáticos para proporcionar al paciente diabético una mejora en su calidad de vida; no obstante, la investigación está orientada principalmente en la obtención de nuevas drogas hipoglucémicas que puedan ayudar al control de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro país y en otros países con un nivel socioeconómico semejante, un sector amplio de la población no tiene acceso a modernos esquemas de tratamiento, por las limitaciones económicas y culturales, surgiendo entonces la fitoterapia o medicina natural como una alternativa de igual efectividad, pero con menores efectos secundarios típicos de las drogas sintéticas y con la ventaja de ser más económica (Hunt *et al.*, 2000).

Los extractos de plantas medicinales pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y mejorar la condición integral de los diabéticos, no sólo por sus efectos

hipoglucémicos, sino también al mejorar el perfil lipídico y el estado antioxidante (Yeh *et al.*, 2003).

El procedimiento de extracción es determinado por el tipo de compuestos que se desean obtener. Así, los procesos de hidrodestilación son utilizados en la obtención de aceites esenciales, aromáticos y enriquecidos en compuestos de naturaleza terpénica. Si lo que se requiere es obtener fracciones que conserven sus propiedades antioxidantes, se recurre, entre otros, a procesos de extracción por disolvente (etanol, metanol, acetona, n-hexano, etc.). La polaridad del disolvente va a determinar, en este caso, la proporción entre los diferentes compuestos presentes en los extractos (Suhaj, 2006).

3.9 Género *Justicia*

El género *Justicia* también es identificado como *Jacobinia*, incluye a plantas perennes nativas de América tropical, de hojas verdes ovaladas con venas bien marcadas y con flores tubulares rosas, naranjas o rojo pálido. Perteneciente a la familia Acanthaceae con más de 600 especies reconocidas (Correa y Alcántara, 2012). En la *tabla 4* se enlistan algunas especies del género *Justicia* y la actividad biológica que presenta.

Tabla 4. Actividad biológica de algunas especies del género *Justicia*. Tomado y modificado de Correa y Alcántara, 2012.

Especie	Parte estudiada	Actividad biológica	Ensayo
<i>nessi</i>	Parte aérea	Anticancerígena	Extracto etanólico
<i>pectoralis</i>	Hojas y tallo	Hipoglucémica	Infusión
<i>seríceea</i>	Parte aérea	Antiinflamatoria	Decocción
<i>spicigera</i>	Parte aérea	Hipoglucémica	Extracto etanólico

3.9.1 Taxonomía de *Justicia spicigera* (Tabla 5).

<i>Justicia spicigera</i>	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Acanthaceae
Género	<i>Justicia</i>
Especie	<i>Spicigera</i>

3.9.2 Descripción botánica de *Justicia spicigera*

Justicia spicigera es un arbusto erecto, ramificado, trepador que mide de 1.5 - 2.5 m de largo, con hojas pecioladas y un margen entero de color verde oscuro de 7 - 15 cm

de largo y de 4 - 9 cm de ancho, con venas marcadas; las flores son anaranjado brillante y se encuentran agrupadas en la unión del tallo y la hoja, éstas cuelgan del tallo, (*Figura 14, 15 y 16*) por lo que también se le denomina: Trompetilla, aunque también se le conoce como: muicle, mucle, muitle o muite (Ortíz-Andrade *et al.*, 2012).



Figura 14. Parte aérea de *Justicia spicigera*.



Figura 15. Hojas de *Justicia spicigera*.



Figura 16. Flor de *Justicia spicigera*.

3.9.3 Distribución geográfica de *Justicia spicigera*

Como se muestra en la figura 17, *Justicia spicigera* crece desde México hasta América central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Colombia). En México crece en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luis Potosí, Valle de México, Veracruz, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán, Hidalgo y Michoacán (Martínez, 1992; Cevallos y Sergio, 1998). Crece en climas: cálido, semicálido, seco y templado, es cultivada en las casas y se asocia a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, bosques de encino y pino.



Figura 17. Distribución geográfica de *Justicia spicigera*, en los puntos amarillos se representan las zonas donde crece *Justicia spicigera*.

3.9.4 Usos de *Justicia spicigera* en la medicina tradicional Mexicana.

A *Justicia spicigera* se la ha atribuido que alivia más de 20 diferentes malestares y enfermedades en diferentes formas de ser ingeridas sus partes sin presentar contraindicaciones en su uso (Tabla 6). *Justicia spicigera* es una planta utilizada por algunas etnias de México como tónico sanguíneo, estimulante, antidisentérico, antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio, para aliviar trastornos menstruales, anemia, nervios, insomnio, bronquitis, desordenes intestinales incluyendo náuseas, diarrea y vómito, para tratar el cáncer, infecciones renales y anemia (Peña-Agüero, 2010). Para cualquiera de los padecimientos, se utilizan a menudo las hojas y las ramas. No existen reportes negativos en su uso. Su tiempo de recolección es en primavera (marzo-mayo) cuando florece y las hojas están verdes.

Tabla 6. Usos de *Justicia spicigera* en la medicina tradicional Mexicana.

Parte de la planta	Uso terapéutico	Referencia
Extracto clorofórmico, Infusión de la flor	Hipertensión	Esquivel-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2013
Extracto etanólico	Diabetes , dolor abdominal, diarrea, antibiótico, antifúngico	Vega-Avila <i>et al.</i> , 2009. Rev. Latinoamer Quím. 40: 78 – 82 Ortíz-Andrade <i>et al.</i> , 2012 <i>J. Ethnopharmacol.</i> 143: 455-462
Decocción de hojas y flor Infusión de la flor	Sífilis, tumores	Martínez, 2005. Las plantas medicinales de México (tomo I). 225-226
Extracto metanólico	Fiebre, anemia, edema, mareos	Meckes <i>et al.</i> , 2004. <i>Phytomedicine</i> 11: 446 – 451
Extracto etanólico	Cáncer, tos, bronquitis, asma, catarro	Vega-Avila <i>et al.</i> , 2009. <i>Proceedings of Western Pharmacology Society</i> 52: 78–82

Tradicionalmente, en la península de Yucatán, las hojas se utilizan como una infusión y está indicado para el tratamiento de la hipertensión y la epilepsia, así como para el tratamiento de dolencias relacionadas con el sistema digestivo, tales como dolor de estómago, diarrea, disentería y el estreñimiento. Además, se utiliza la decocción de las hojas o ramas (y a veces la flor) para los casos de enfermedades de la piel, tales como erisipela (infección de la piel causada por el ácaro de la sarna), sífilis y tumores. También está indicado su uso en fiebre, infección renal, anemia, así como anti-inflamatorio, por mareos y sueño, para algunas enfermedades respiratorias como tos, bronquitis y estreñimiento. También hay informes de que tanto la infusión de las hojas, como la decocción de las partes aéreas, se utilizan para el tratamiento de la DM (www.microdosismartinez.blogspot.com; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

En la Huasteca Potosina (San Luis Potosí, México) hacen un té hirviendo 20 g de *Justicia spicigera* con 1 litro de agua. El té se toma 3 veces al día antes de cada comida. Andrade-Cetto y Heinrich (2005), informaron que las infusiones de *Justicia spicigera* disminuyen la glucemia.

El extracto etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* ha demostrado actividad contra *Giardia duodenalis*, uno de los parásitos intestinales más comunes en México asociado con diarrea (Ponce-Macotela *et al.*, 2001).

Ortíz-Andrade *et al.*, (2012), reportaron el efecto hipoglucémico del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en ratas normoglucémicas y diabéticas, donde le atribuyen éste efecto a la estimulación de la captación de glucosa tanto en ratas sensibles a la insulina y a las resistentes a la insulina.

3.9.5 Estudio fitoquímico de *Justicia spicigera*

Justicia spicigera produce metabolitos secundarios del tipo fenólico, como taninos, lignanos y flavonoides (Martínez, 1996). Se han reportado en hojas de *Justicia spicigera*: alantoina, flavonoides como el Kaempferitrin y su bis-ramnósido Kaempferol (Euler *et al.*,

1982), terpenoides como el β -glucosil-O-sitosterol y la criptoxantina (caroteno) (Domínguez *et al.*, 1990).

La alantoína es un producto del metabolismo de las purinas. Su principal efecto es ser un fuerte estimulador de la proliferación celular y reconstrucción de tejido (Yardim-Akaydin *et al.*, 2004).

El Kaempferol es un flavonoide natural que se encuentra presente en las hojas de *Justicia spicigera*, es un antioxidante potente que ayuda a prevenir el daño oxidativo de las células, lípidos y ADN, además de prevenir la aterosclerosis (Watell *et al.*, 2003). Ha mostrado propiedades hipoglucémicas en ensayos *in vitro* e *in vivo* (De Sousa *et al.*, 2004). También actúa como agente inhibidor de la formación de cáncer en las células (Wang *et al.*, 2005). López-Sánchez *et al.*, (2007) mencionan que el Kaempferol ayuda a prevenir la aterosclerosis inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la formación de plaquetas en la sangre. Zheng *et al.*, (2001), demuestran que el kaempferol (Figura 18) puede tener beneficios para las personas que tienen riesgo de cáncer, ya que en líneas celulares pancreáticas (MIA PaCa-2 y Panc-1) se muestra un efecto anticancerígeno.

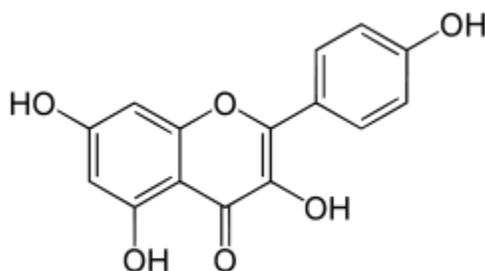


Figura 18. Estructura química del kaempferol.

El β -sitosterol es el esteroles más abundante de *Justicia spicigera*, contiene un grupo β -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol, lo que lo hace más lipofílico. Presenta actividad inmunológica y antiinflamatoria (Bouic, 1996, 1999, 2001; Gómez, 1999). Además se ha demostrado su efectividad clínica como hipocolesterolémico, así como en el

tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (Becker *et al.*, 1993; Berges *et al.*, 1995; Pelletier *et al.*, 1995; Gerber, 2002; Tapiero, 2003).

Los lignanos también se han identificado en el género *Justicia* y tienen actividad antioxidante, antiviral, antitumoral, hipoglucémica, antiobesidad y cardioprotectoras (Smeds *et al.*, 2012). Zepulveda *et al.*, (2009) analizaron la parte aérea de *Justicia spicigera* y para una misma parte de la planta, obtuvieron que los extractos preparados con metanol poseen una mayor actividad antioxidante, mayor cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides.

El contenido fenólico y la actividad antioxidante de los extractos depende de las condiciones del disolvente o de extracción utilizados (Ares *et al.*, 2010; Serrano-Maldonado *et al.*, 2011;). La sinergia entre los compuestos químicos genera actividad antioxidante que no depende sólo de la concentración y la estructura de cada uno, sino que, la interacción con otros elementos de la mezcla es otro factor que también puede contribuir a la actividad captadora de RL (Castro *et al.*, 2006). El procedimiento de extracción es determinado por el tipo de compuestos que se desean obtener. Así, los procesos de hidrodestilación son utilizados en la obtención de aceites esenciales, aromáticos y enriquecidos en compuestos de naturaleza terpénica. Si lo que se requiere es obtener fracciones que conserven sus propiedades antioxidantes, se recurre a procesos de extracción por disolvente (etanol, metanol, acetona, n-hexano, etc.). La polaridad del disolvente va a determinar, en este caso, la presencia de los diferentes compuestos en los extractos (Suhaj, 2006).

3.10 Métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Existen diferentes maneras de determinar la capacidad antioxidante del extracto de una planta, cada ensayo se basa en reacciones químicas diferentes y por lo tanto, la actividad antioxidante de una misma muestra puede variar dependiendo del método de análisis empleado (Huang *et al.*, 2005). Los resultados pueden alejarse considerablemente de la acción de tales agentes en sistemas biológicos (Antolovich *et al.*, 2002).

Los métodos para ensayar la actividad antioxidante de una muestra pueden ser clasificados en dos categorías:

1) Aquellos métodos que miden la capacidad para ceder un electrón (o un átomo de hidrógeno) a una ERO específica o a cualquier otro aceptor electrónico.

2) Métodos que determinan la capacidad para eliminar la fuente de inicio del proceso oxidativo, por ejemplo, inhibición enzimática, quelación de metales de transición, absorción de luz UV (Vaya y Aviram, 2001).

La efectividad de los antioxidantes en sistemas biológicos se ve afectada por muchos factores, entre los principales, se incluyen: el reparto de los compuestos entre las fases del sistema, las condiciones de oxidación y el estado físico del sustrato oxidable. Para conocer, entender y predecir cómo los antioxidantes naturales ejercen su acción, es necesario tener en cuenta todos los factores que pueden influir sobre un ensayo de determinación de la actividad antioxidante. Debido precisamente a estos factores condicionantes, no es apropiado utilizar un único ensayo para valorar el potencial antioxidante de un compuesto o de una mezcla compleja de compuestos (Magalhães *et al.*, 2008). Por ello, es de suma importancia la selección de los métodos a aplicar. A continuación se describen algunos de los ensayos habitualmente utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos aislados o de mezclas de compuestos.

3.10.1 Reducción del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Es un ensayo de capacidad secuestradora contra el radical DPPH[•], el cual se basa en la reducción del radical por captación de un átomo de hidrógeno al añadir el antioxidante. El radical DPPH[•] conocido como 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, cromógeno color púrpura, que se utiliza comúnmente para evaluar la capacidad de los compuestos para actuar como captadores de RL o donantes de H⁺ y para medir la actividad antioxidante. La reacción del DPPH[•] con un antioxidante o compuesto reductor, produce el DPPH₂ (hidracina correspondiente), que puede ser seguido por el cambio de color de púrpura (absorbencia a 515-528 nm) a amarillo (Cayman Chemical.,

2015). Este método es rápido, simple, de bajo costo y ampliamente utilizado para medir la capacidad de los compuestos para actuar como eliminadores de RL o donantes de H⁺. La ventaja de este método es que el DPPH[•] se deja reaccionar con la muestra el tiempo suficiente, lo que permite reaccionar lentamente, incluso con antioxidantes débiles (Figura 19). La eficacia antioxidante se mide a temperatura ambiente de manera que el riesgo de degradación térmica de las moléculas ensayadas se elimina (National Center for Biotechnology Information, U.S., 2011).

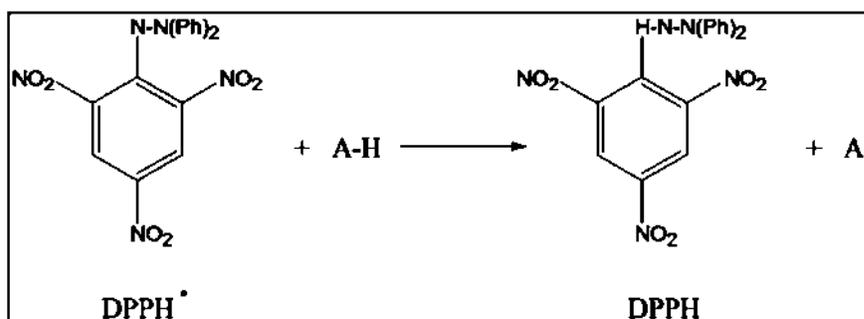


Figura 19. Estructura del DPPH[•] y la reducción difenil-picrilhidrazina (DPPH-H) por un antioxidante (Magalhaes *et al.*, 2008).

3.10.2 Método de reducción del fosfomolibdeno

El ensayo de la reducción de fosfato de molibdeno (VI) a fosfato de molibdeno (V) está basado en la reducción del Mo (VI) proporcionado por el molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) a Mo (V), en un pH ácido que en disolución presenta un color amarillo, reducido por un agente reductor y la subsecuente formación de un complejo fosfato/Mo (V) denominado azul de fosfomolibdeno, que tiene un pico de absorción a 695 nm (Prieto *et al.*, 1999). La incubación de los extractos con molibdeno (VI) indicará la presencia de componentes antioxidantes en el extracto, que pueden ser evaluados mediante el registro de la absorbencia a 695 nm (para detectar el complejo de molibdeno verde reducido). El método del fosfomolibdeno se aplica rutinariamente en el laboratorio para evaluar la capacidad antioxidante de extractos de plantas (Prieto *et al.*, 1999).

3.10.3 Poder reductor

Esta técnica se fundamenta en que el ión férrico (Fe^{3+}) se reduce por antioxidantes donantes de electrones presentes en la muestra a su forma ferrosa (Fe^{2+}). El complejo desarrolla un producto de color azul oscuro después de la reducción, el cual se puede determinar espectroscópicamente a 700 nm (Roginsky y Lissi, 2005). El incremento de la absorción muestra un aumento en el poder reductor de los extractos, es decir, cuanto mayor es la absorbencia de la mezcla de reacción, mayor será el poder reductor.

3.10.4 Antilipoperoxidación

El ensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) determina las sustancias reactivas a este ácido generadas durante el estrés oxidativo. La degradación oxidativa de los lípidos por las ERO, llamada peroxidación lipídica, se traduce en la formación de peróxidos de lípidos altamente reactivos e inestables. La principal sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (ATB), el malondialdehído (MDA), es un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo (Figura 20), generado como uno de los principales bio-productos de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. La determinación de los niveles de MDA en materiales biológicos es un método conveniente, sensible y ampliamente utilizado para estimar cuantitativamente la extensión de la peroxidación lipídica. El método espectrofotométrico del ATB es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA. La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del ATB. Un mol de MDA reacciona con dos moles de ATB en medio ácido a alta temperatura. La velocidad de esta reacción depende de la concentración de ATB, la temperatura y el pH. El cromóforo generado posee un pico de absorción a 532-535 nm. (Ohkawa *et al.*, 1979; Magalhães *et al.*, 2008). El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica reflejará el poder antioxidante de los compuestos estudiados (Ohkawa, 1979).

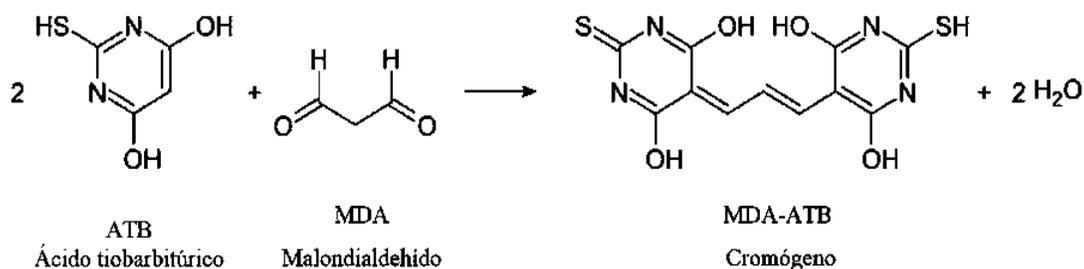


Figura 20. Reacción entre el ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído.

Aunque la actividad antioxidante se puede determinar mediante pruebas *in vitro*, este tipo de pruebas pueden alejarse considerablemente de la acción de tales agentes en sistemas biológicos (Antolovich *et al.*, 2002), por lo que los extractos implicados en este trabajo se probaron “*in vivo*” en un modelo de ratas de la cepa Wistar con DM I.

4. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica-degenerativa que produce daño a diferentes órganos. Tal daño se relaciona con el estrés oxidativo, que puede ser disminuido con antioxidantes exógenos, como los presentes en las hojas de *Justicia spicigera*, de la cual se ha reportado un efecto hipoglucémico, sin embargo, se desconoce si existe una relación entre los compuestos presentes en los extractos de diferente polaridad, su actividad hipoglucémica y su capacidad antioxidante.

5. HIPÓTESIS

Los extractos de las hojas de *Justicia spicigera* presentan actividad hipoglucémica y disminuyen el daño oxidativo en riñón y cerebro de ratas diabéticas.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar la actividad hipoglucémica y la capacidad antioxidante de los extractos de las hojas de *Justicia spicigera* en ratas diabéticas.

6.1 Objetivos específicos

1.- Analizar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera*.

2.- Determinar los parámetros serológicos de daño renal y lípidos en ratas diabéticas administradas con los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera*.

3.- Analizar moléculas antioxidantes de riñón y cerebro de ratas diabéticas administradas con los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo durante los años 2016-2017 en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

7.1. Reactivos

Todos los reactivos y sustancias empleadas fueron de grado reactivo de la marca SIGMA de la más alta pureza disponible en el mercado.

7.2 Identificación y recolección de la planta *Justicia spicigera*

La planta fue identificada y colectada en los meses de abril y mayo de 2016 del invernadero del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

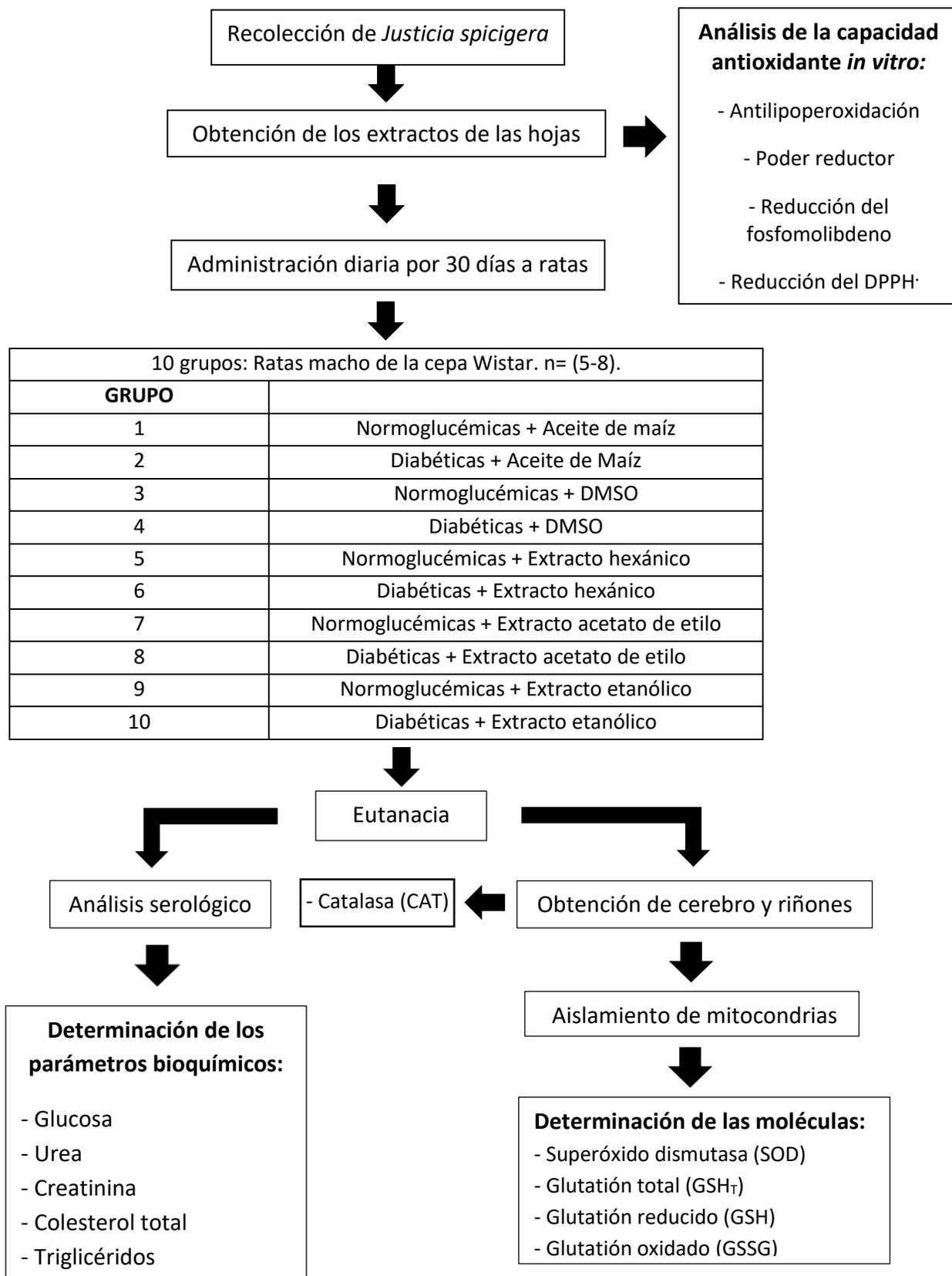
7.3 Obtención de los extractos de las hojas de *Justicia spicigera*

De las hojas, se obtuvieron extractos bajo 3 diferentes sistemas de polaridad: hexáno (baja polaridad), acetato de etilo (polaridad intermedia) y etanol (alta polaridad). Una vez identificada la planta *Justicia spicigera*, se procedió a revisar que la muestra (hoja) estuviera en buen estado, es decir que no presentara ninguna enfermedad o plaga. Se tomaron las hojas y se lavaron con agua y se secaron a la sombra hasta quitar el exceso de agua. Se dividieron en grupos individuales rotulados y se congelaron a -80°C por 24 horas en un revco. Pasadas las 24 horas de congelación, se trituraron con una licuadora industrial (Oster) para después colocarlas en un frasco ámbar y se adicionaron los solventes correspondientes (hexáno, acetato de etilo y etanólico) en relación 1:10 (p/v) y se mantuvieron en maceración durante 6 días a 4°C agitado una vez al día, excepto el último día, protegiendo de la luz en recipientes cerrados herméticamente. El macerado se filtró con papel filtro y se desechó el material vegetal. El filtrado se concentró a presión reducida en un rotavapor a 90 rpm, en un matraz a peso constante. Cada extracto se preparó a una concentración de 100 mg/kg. Para los bioensayos, el extracto hexánico se disolvió en aceite de maíz de la marca “Mazola” y los extractos acetato de etilo y etanólico se disolvieron en agua y DMSO al 5 % y se conservaron a 4°C protegidos de la luz hasta su uso.

7.3.1 Rendimiento de los extractos

El porcentaje de rendimiento de cada extracto se calculó dividiendo el peso (g) de lo que se obtuvo de extracto entre el peso de las hojas frescas por 100.

7.4 Diseño experimental



A los animales se les tomó diario el dato del peso del alimento y el volumen de agua ingeridos; cada 5 días fueron pesadas en una báscula digital y se les midió la glucemia con un glucómetro ACCU-CHECK Performa.

7.4.1 Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar, con un peso de 300 – 400 g, las cuales fueron alojadas en bioterio y mantenidas con ciclos de 12 horas de luz/obscuridad, en condiciones de temperatura controlada, alimentadas con una dieta estándar de roedores y agua purificada *ad libitum*. La dieta de los animales consistió en alimento para roedores de laboratorio con una presentación comercial de croquetas. Todo bajo la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999 del uso y cuidado de animales de laboratorio. Los extractos fueron administrados vía oral con una cánula orofaríngea siempre a la misma hora.

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

Una de las características principales de la DM es la hiperglucemia crónica, por lo tanto, la medición de los niveles de glucemia en las ratas empleadas para los experimentos es importante, ya que así aseguramos contar con un modelo adecuado de diabetes; a la par de que, siendo la pérdida de peso otro signo de la DM, se tomó el dato del peso corporal cada 5 días, en una báscula digital de cada uno de los animales.

Los niveles de glucemia se determinaron utilizando el método de glucosa-oxidasa. Para esto, se empleó un equipo de glucómetro ACCU-CHECK Performa. El fundamento físico y bioquímico es el de la enzima-sustrato, que explica el funcionamiento del glucómetro, ya que las tiras reactivas contienen una enzima que cataliza la glucosa contenida en una muestra de sangre capilar. Ninguna molécula de glucosa se transforma si no entra en contacto con la enzima glucosa deshidrogenasa. El flujo de electrones producido en esta reacción, es detectado por un fino sensor de corriente eléctrica que es interpretada como cantidad de glucosa en la muestra. La determinación de la glucemia se realiza individualmente en cada uno de los animales después de haber permanecido 12 horas sin alimento; y con ayuda de una lanceta metálica estéril se hace una punción en la

vena caudal de la cola del animal para exponer una gota de su sangre sobre una tira reactiva.

7.4.1.2 Medición de la ingesta de alimento y agua durante el tratamiento

Como ya se mencionó, algunos signos de la DM son: la polifagia y la polidipsia, por lo tanto, la medición de la ingesta de alimento y de agua en las ratas empleadas para los experimentos es importante, ya que así aseguramos contar con un modelo adecuado de DM. De manera diaria y a la misma hora, se les tomó el dato de la ingesta de alimento (pesándolo en báscula) y agua (medida con probetas) a todos los grupos.

7.4.2 Inducción de la diabetes a las ratas

La diabetes experimental fue inducida por la administración de una dosis intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) a 50 mg/kg de peso corporal, disuelta en buffer de citrato (pH 4.4). La glucemia fue medida antes de la inducción, ya que las ratas fueron privadas de alimento 12 horas antes de la administración de la STZ. Las ratas control fueron administradas solo con buffer de citrato. Cinco días después de la administración de STZ, los niveles de glucemia se determinan para confirmar la diabetes.

7.4.3 Eutanacia de las ratas

A los animales se les privó el alimento 12 horas antes de proceder con la eutanacia, la cual se realizó por decapitación, recolectándose la sangre en tubos BD Vacutainer, el cerebro y los riñones se trituraron inmediatamente.

7.4.4 Aislamiento de mitocondrias de riñón

Después de que se extrajo el riñón, se colocó en un vaso que contenía medio 1 en un recipiente que contenía hielo. Se trituró en pequeños pedazos y se procedió a hacer 2 lavados con medio 1. Se pasaron a un tubo de homogeneización con 20 ml de medio y se homogenizó 3 veces. Se repartió el homogenado en 2 tubos de centrifuga y se aforó a $\frac{3}{4}$ partes con medio 1. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se pasó el sobrenadante a 2 tubos previamente fríos, aforando a $\frac{3}{4}$ partes de volumen y se continuó centrifugando a 7,500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se desechó el

sobrenadante y se suspendió el precipitado cuidadosamente en 2 ml de medio 2. Se agregaron 80 µl de albúmina al 0.2 % por ml de suspensión de mitocondrias, durante 10 minutos agitando. Pasado el tiempo se aforó a $\frac{3}{4}$ partes del volumen y se centrifugó a 9,000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se suspendió en 1 ml de medio 2. Por último, se determinó la concentración de proteína mitocondrial por el método de Biuret (**Gornall *et al.*, 1949**).

7.4.5 Aislamiento de mitocondrias de cerebro

Después de la eutanasia, se extrajo el cerebro en el lapso de 1 minuto, el cual se colocó en 1 vaso de precipitado con 7.5 ml de medio de aislamiento; se trituró con tijeras especiales y se lavó con pequeñas cantidades de medio (por las paredes del tubo). El tejido se pasó a homogeneizar de manera manual (teniendo cuidado de que no se hicieran burbujas) esto se hizo por 6 veces hasta que quede completamente homogéneo. El homogenado se centrifugó a 2,180 rpm por 10 minutos; se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 10,350 rpm por 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 ml de medio de aislamiento.

7.4.6 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949). Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen que tuviera una concentración de 0.3 mg/ml, que fue empleada en todos los experimentos.

7.5 Cuantificación de las concentraciones de glutatión total, reducido y oxidado en mitocondria

Para la determinación del contenido total de glutatión se usaron las muestras de mitocondrias a 0.3 mg/ml y fueron desproteinizadas empleando una solución de ácido sulfosalicílico al 5% durante 10 minutos a 4° C. Posteriormente fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 minutos. Se separó el sobrenadante y se agregó la “mezcla de trabajo”

la cual contenía buffer de análisis 1x (buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7, EDTA 1 mM), glutatión reductasa (6 u/ml) y solución de DTNB (1.5 mg/ml). Las muestras se incubaron por 5 minutos y se agregó el NADPH para comenzar la reacción. Se tomaron lecturas a intervalos de 1 minuto durante 5 minutos a 412 nm empleando un lector de microplacas iMark Microplate Absorbance Reader de BIO-RAD. Para la determinación del glutatión oxidado no se agregó la enzima glutatión reductasa y para la determinación del glutatión reducido fue por cálculo aritmético. Se realizó una curva estándar de glutatión en cada experimento.

7.6 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa en las mitocondrias

La actividad de la SOD fue determinada empleando un kit comercial (Sigma-Aldrich), el cual permite analizar la actividad de la SOD mediante un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio Dojindo altamente soluble en agua, WST-1 (sal monosódica (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que produce un color formazan cuando es reducida por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. La concentración de proteína empleada fue de 0.3 mg/ml. Las lecturas fueron tomadas a 440 nm empleando un lector de microplacas iMark Microplate Absorbance Reader de BIO-RAD.

7.7 Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa se midió siguiendo su capacidad para descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en 1 minuto de reacción. La reacción se detuvo añadiendo dicromato de potasio / ácido acético (1:3); el H_2O_2 restante se determinó midiendo acetato crómico a 570 nm que se forma por reducción del dicromato / ácido acético en presencia de H_2O_2 , como se describió anteriormente por *Sinha (1972)*. La actividad de la catalasa se expresó como μ mol de H_2O_2 descompuesto / min / mg de proteína.

7.8 Análisis serológico de las muestras sanguíneas

Las ratas fueron sacrificadas por medio de decapitación, se les obtuvo la sangre y fue colocada en tubos Vacutainer, dejando coagular la sangre, posteriormente se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 min para obtener el suero, al cual se le realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos (valores figura 7) a través del equipo Dri-Chem NX500i Fujifilm con sus correspondientes slides.

Tabla 7. Valores normales de parámetros serológicos de glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos en ratas Wistar macho. Tomado de Giknis y Clifford, 2008; Sharp y Villano, 2013.

Prueba	Rango (mg/dL)
Glucosa	65 – 110
Urea	15 – 45
Creatinina	0.3 – 1.0
Colesterol	45 – 85
Triglicéridos	30 – 100

7.9 Pruebas de la capacidad antioxidante *in vitro*

7.9.1 Reducción del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

La actividad antioxidante del extracto basada en la reducción del radical libre estable DPPH[•], se determinó de acuerdo al método descrito por Lee *et al.* (2004) de la siguiente forma: 0.1 ml de extracto fue añadido en tubos completando un volumen de 1 ml con agua desionizada, se añadió a cada tubo 1 ml de la solución DPPH[•] (0.2 mM en etanol absoluto), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 30 minutos. Se preparó un control positivo con una solución de ácido ascórbico (0.3 mg/ml). La absorbencia se registró a 517 nm usando un espectrofotómetro Perkin lamda. El porcentaje de actividad reductora se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción del radical DPPH}^{\bullet} = [(D.O._{517\text{control}} - D.O._{517\text{muestra}}) / D.O._{517\text{control}}] \times 100.$$

7.9.2 Reducción del fosfomolibdeno (VI)

La reducción del fosfomolibdeno fue evaluada por el método que describe Kumaran y Karunakaran (2007); para lo cual a 0.1 ml de extracto se le agregó 0.3 ml con agua desionizada, 3 ml de la solución reactiva: ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.6 M, fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 28 mM y molibdato de amonio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 4 mM, se mezclaron e incubaron a 95°C por 90 min. El blanco fue preparado de la misma manera. Una solución de ácido ascórbico (0.30 mg/mL) se utilizó como control positivo. Después de enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbencia a 695 nm y se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ De reducción del fosfomolibdeno (VI)} = [(D.O. \text{ EXT} / D.O. \text{ ÁC. ASC.})] \times 100.$$

Dónde:

D.O. EXT: Densidad óptica de la muestra tratada con el extracto.

D.O. ÁC. ASC: Densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico.

7.9.3 Poder reductor

El poder reductor del extracto fue determinado por el método de Cell Biolabs, (2015) de la siguiente forma: se añadió a cada tubo 0.1 ml de extracto y se completó el volumen a 1 ml con agua destilada, 2.5 ml de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 ml de solución de ferrocianuro de potasio ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) al 1% (p/v) se mezclaron mediante vortex, se incubaron a 50°C por 20 min, después se agregó 1.5 ml de la solución de ácido tricloroacético (ATC) al 10 % (p/v) a cada mezcla y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. Se tomaron 2.5 ml de sobrenadante y se mezclaron con 2.5 ml de agua, se añadió 0.5 ml de cloruro férrico (FeCl_3) al 0.1% (p/v), se mezcló en vortex, finalmente se determinó la absorbencia a 700 nm. Se preparó un blanco de reactivos. Se hizo uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Poder reductor} = (D.O. \text{ EXT} \times 100) / D.O. \text{ ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: Densidad óptica de la muestra tratada con el extracto.

D.O. ÁC. ASC: Densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico.

7.9.4 Antilipoperoxidación

Se utilizó el ensayo modificado de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico descrita por Ohkawa *et al.*, 1979, para lo cual 0.5 ml de homogenado de yema de huevo al 10% (p/v) fueron mezclados con 0.1 ml de extracto, se completó el volumen a 1 ml con agua destilada. Se adicionaron 5 µl de sulfato ferroso (FeSO₄) 0.07 M, se incubó por 30 minutos y posteriormente se adicionó 1.5 ml de ácido acético al 20% (pH 3.5 ajustado con NaOH), 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.8% (p/v) en duodecil sulfato de sodio al 1.1 % y 0.5 ml de ácido tricloroacético (ATC) al 20%. La solución se mezcló en vortex y después se calentó a 95°C por 60 minutos. El control se preparó de la misma forma sin el extracto, así como, una solución de ácido ascórbico (0.30 mg/ml) como control positivo. Posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 15°C. Se determinó la absorbencia del sobrenadante a 532 nm, el porcentaje de antilipoperoxidación se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de Antilipoperoxidación} = (\text{D.O. EXT} \times 100) / \text{D.O. ÁC. ASC.}$$

Dónde:

D.O. EXT: Densidad óptica de la muestra tratada con el extracto.

D.O. ÁC. ASC: Densidad óptica de la muestra tratada con el ácido ascórbico.

7.10 Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm la desviación estándar (S.D.) de 3 o más experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada con la prueba estadística *t*-Student empleando el software GraphPad Prism 5.0 y Sigma Plot 11.0.

8. RESULTADOS

Los niveles de glucemia en ratas tratadas con aceite de maíz (A) del grupo normoglucémico se mantuvieron dentro de los valores normales (75 - 90 mg/dL) y en los del grupo diabético, los valores fueron de 400 mg/dL (figura 21). Sin embargo, las ratas del grupo diabético tratado con el extracto hexánico (B), los niveles de glucemia fueron alrededor de 300 mg/dL, siendo significativamente diferente (menores) comparado con el grupo control (aceite de maíz) diabético.

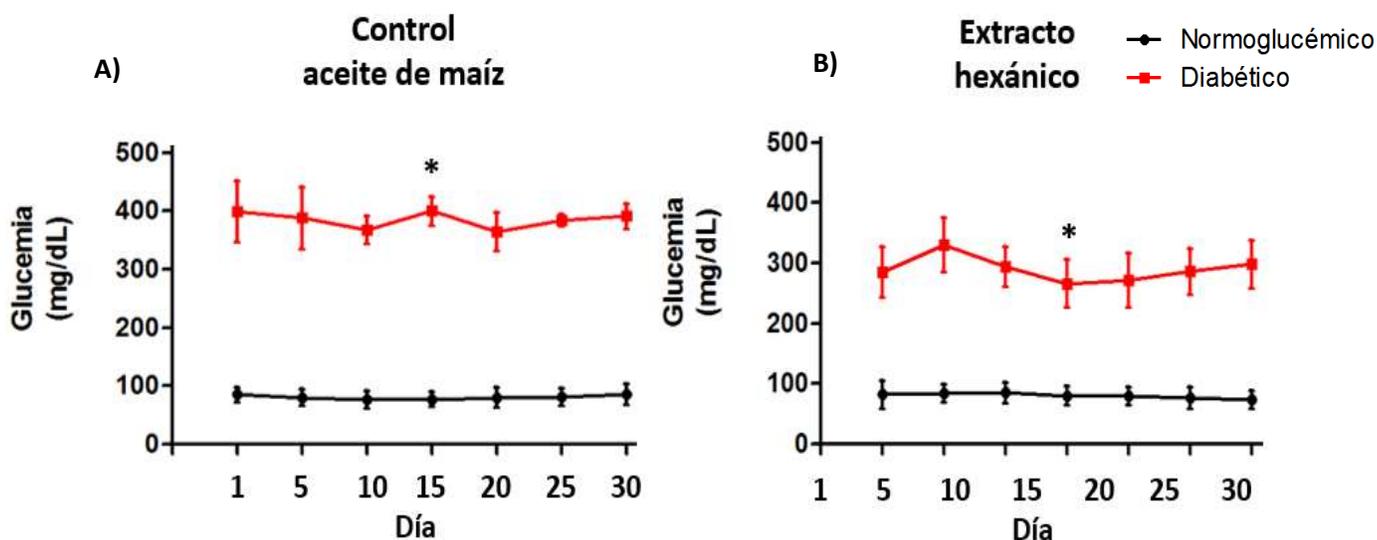


Figura 21. Glucemias durante el tratamiento de los grupos control (Aceite de maíz A) y los tratados con el extracto hexánico (B). Los valores representan la media \pm la S.D. $n=5-8$. Los datos se analizaron con la prueba estadística *t*-Student. * $p<0.001$ Normoglucémico vs Diabético.

Las ratas de los grupos normoglucémicos tratadas con DMSO (Figura 22 A) presentaron glucemias entre 80 - 100 mg/dL, mientras que las de los grupos tratados con los extractos acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* (Figura 22 B y C), los niveles de hiperglucemia fueron inicialmente de 360 mg/dL para después disminuir hasta un promedio de 210 mg/dL, valores significativamente diferentes a los 30 días de tratamiento, pero sin llegar a concentraciones normales, pero ejerciendo efecto hipoglucémico.

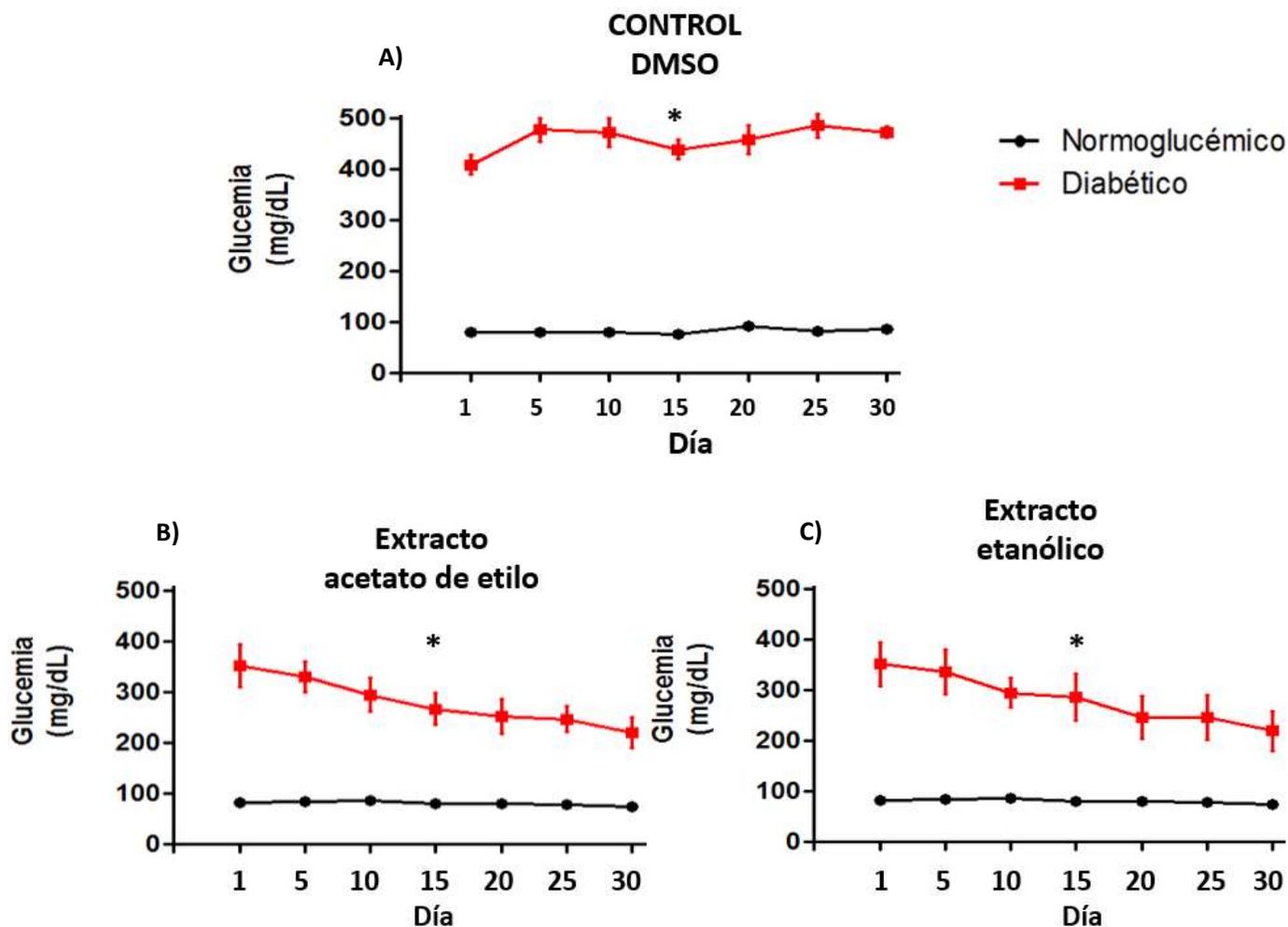


Figura 22. Glucemias durante el tratamiento de los grupos control (DMSO A) y tratados con el extracto acetato de etilo (B) y etanólico (C). Los valores representan la media \pm la S.D. $n= 5-8$. Los datos se analizaron con la prueba estadística *t*-Student. * $p<0.001$ Normoglucémico vs Diabético.

Se llevó a cabo el registro del peso de los animales tanto de los grupo control (aceite de maíz y DMSO) como el de los grupos diabéticos tratados con los extractos y se presentan en la tabla 8 y figura 23 y 24, en donde se pudo observar una ganancia en el peso de las ratas de los grupos control que corresponde con su crecimiento natural, en cuanto a los grupos diabéticos se observó una disminución en el peso corporal, a los grupos administrados con el DMSO se les comenzó a pesar al siguiente día de que fueron administrados con la STZ, mientras que a los demás grupos se le comenzó a registrar 6

días después de la inyección de STZ, por lo que se observa que hay una diferencia significativa desde el inicio del tratamiento en su peso corporal. El grupo administrado con el extracto etanólico fue el que menos peso ganó (normoglucémico) y de los que más perdió (diabético) al término del tratamiento; los grupos normoglucémicos: control y los tratados con los extractos hexánico y acetato de etilo ganaron: + 7 %, + 7 % y + 6 % respectivamente. En los grupos diabéticos: el grupo control (aceite de maíz A) y los grupos administrados con el extracto hexánico (B) y acetato de etilo (B) perdieron el 8 % de su peso corporal y el grupo control (DMSO A) perdieron casi el doble de los anteriores grupos (15 %).

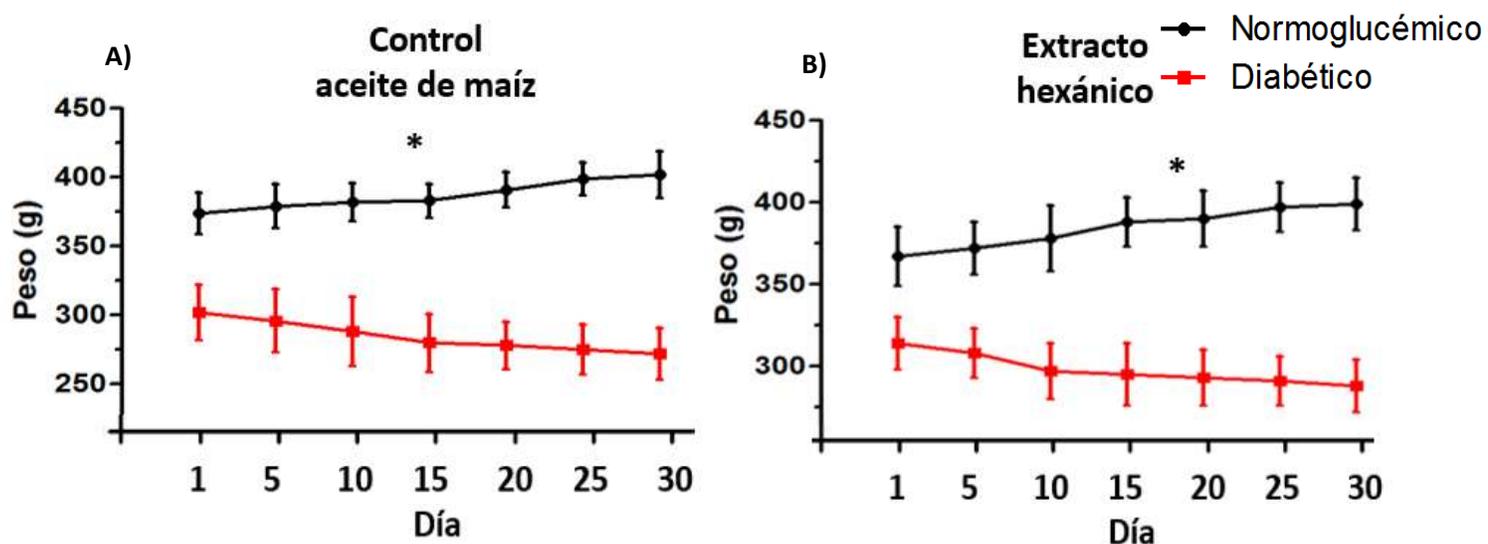


Figura 23. Peso corporal (g) durante el tratamiento de los grupos control (Aceite de maíz A) y los tratados con el extracto hexánico (B). Los valores representan la media \pm la S.D. n= 5-8. Los datos se analizaron con la prueba estadística t-Student. * $p < 0.001$ Normoglucémico vs Diabético.

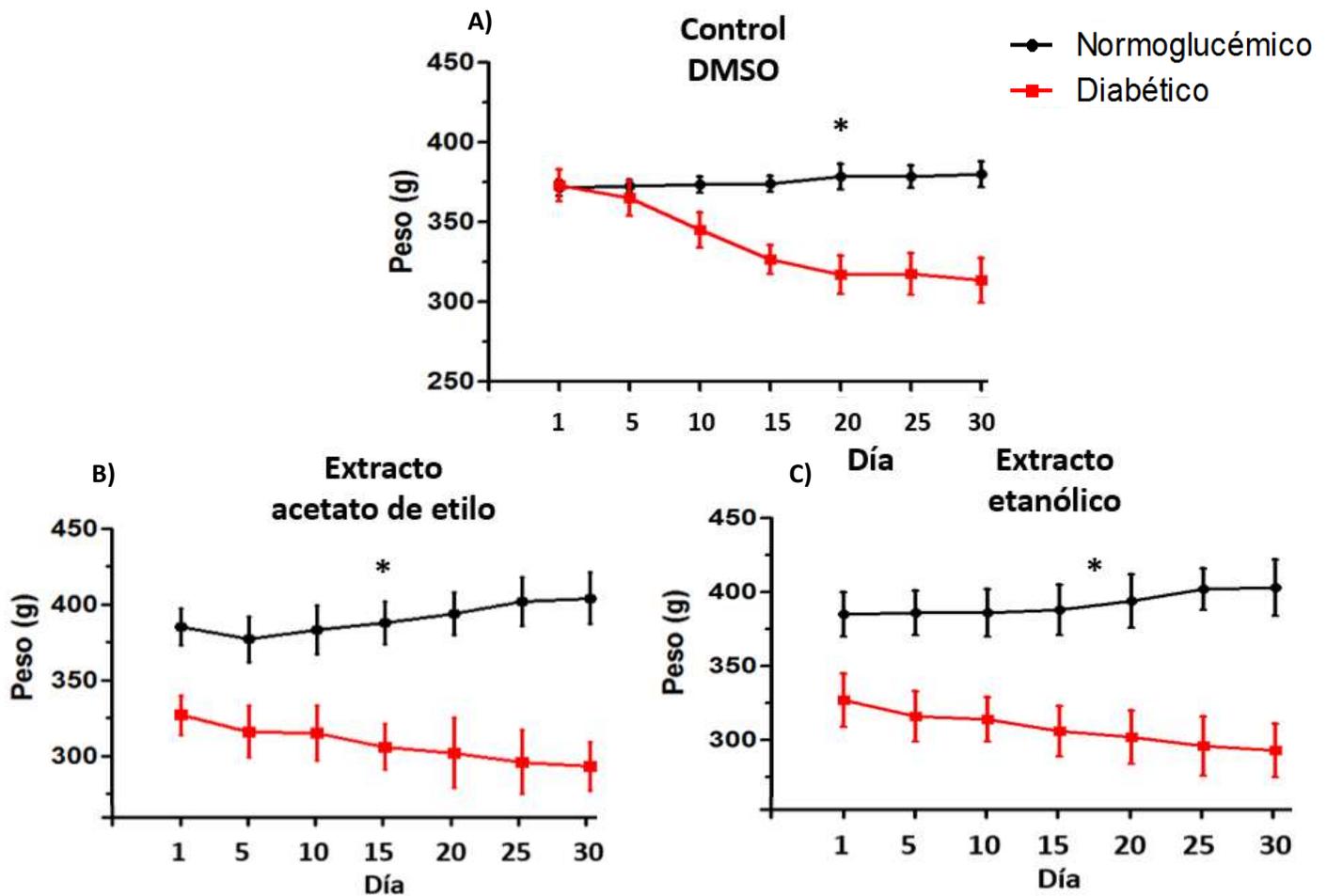


Figura 24. Peso corporal (g) durante el tratamiento de los grupos control (DMSO A) y los tratados con los extractos acetato de etilo (B) y etanólico (C). Los valores representan la media \pm la S.D. $n=5-8$. Los datos se analizaron con la prueba estadística *t*-Student. * $p < 0.001$ Normoglucémico vs Diabético.

Ya que la polidipsia y la polifagia también son signos característicos de la patología diabética, por lo que la medición de estos parámetros es de interés para así comprobar que se contó con un modelo adecuado de diabetes en ratas y también para ver si los extractos modifican estos parámetros. Estos resultados se muestran en la tabla 8. Respecto a la cantidad de ingesta de agua, no hubo diferencias significativas en los grupos normoglucémicos, bebiendo cada rata un promedio de 50 ml diarios, a diferencia de una diabética que bebió alrededor del triple que la normoglucémica (reflejándose la marcada polidipsia) también se observa que las ratas del grupo diabético administrado con el extracto acetato de etilo fue el que más agua bebió. Respecto a la cantidad de ingesta de alimento, no hubo diferencias significativas en los grupos normoglucémicos al consumir un promedio de 27 g por día, a diferencia de los grupos diabéticos que se observa una diferencia significativa en comparación con las normoglucémicas, cabe señalar que el

grupo control administrado con el DMSO consumió el doble de alimento que su normoglucémico. Con estos datos comprobamos que se trabajó con un modelo adecuado de diabetes en ratas y que los extractos no tienen algún efecto en estos parámetros fisiológicos.

Tabla 8. Efecto de los extractos sobre el peso corporal, porcentaje de ganancia de peso, consumo de agua y alimento al término de 30 días de tratamiento. Los datos representan la media \pm la S.D. n=5-8. Recuadros blancos: normoglucémicos, recuadros negros: diabéticos. Los datos se analizaron con la prueba estadística *t*-Student. * $p < 0.05$ Normoglucémico vs Diabético.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (%)	Consumo de agua (ml/rata/día)	Consumo de alimento (g/rata/día)	
Normoglucémicos	Control (aceite de maíz)	374 \pm 5	401 \pm 9	+ 7	51 \pm 3	26 \pm 1
	Extracto hexánico	367 \pm 21	397 \pm 17	+ 7	45 \pm 4	25 \pm 3
	Control (DMSO)	371 \pm 5	390 \pm 8	+ 7	53 \pm 5	28 \pm 5
	Extracto acetato de etilo	374 \pm 7	401 \pm 10	+ 6	54 \pm 6	29 \pm 3
	Extracto etanólico	385 \pm 9	402 \pm 9	+ 4	55 \pm 7	28 \pm 2
Diabéticos	Control (aceite de maíz)	302 \pm 12	272 \pm 10	- 8	145 \pm 10 *	39 \pm 3 *
	Extracto hexánico	314 \pm 16	289 \pm 19	- 8	127 \pm 12 *	38 \pm 4 *
	Control (DMSO)	373 \pm 10	310 \pm 12	- 15	117 \pm 11 *	60 \pm 4 *
	Extracto acetato de etilo	340 \pm 15	313 \pm 13	- 8	160 \pm 10 *	41 \pm 3 *
	Extracto Etanólico	327 \pm 13	293 \pm 28	- 10	140 \pm 9 *	40 \pm 4 *

Capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera*.

En la prueba de reducción del radical DPPH· (Figura 25), los resultados fueron que el aceite de maíz, el extracto hexánico y el extracto etanólico igualaron la reducción de dicho radical con la que redujo el ácido ascórbico; mientras que sí hubo diferencia significativa (en comparación con el ácido ascórbico) en el extracto acetato de etilo que solo redujo solo un 70 % el radical DPPH·.

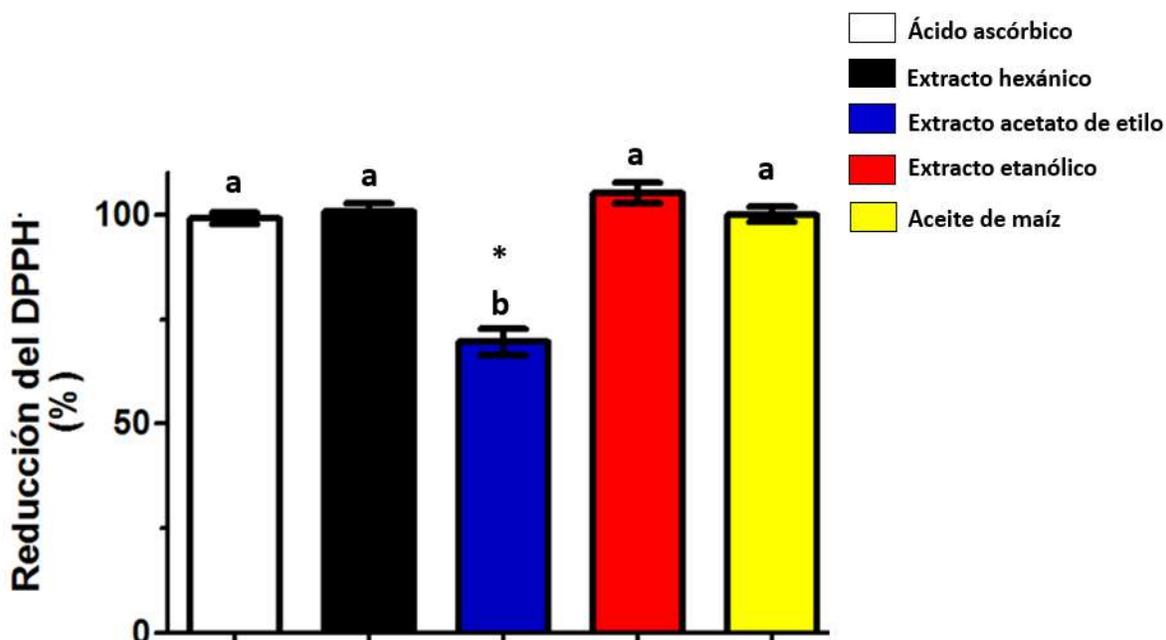


Figura 25. Porcentaje de reducción del radical DPPH·. Datos expresados como la media \pm la S.D. de 3 experimentos independientes por triplicado y se utilizó la prueba estadística *t*-Student * $p < 0.05$ vs ácido ascórbico (Ác. asc). Se tomó como 100 % la actividad del Ác. asc.

Los resultados expresados en porcentaje de reducción del Mo (VI) son presentados en la figura 26, el extracto etanólico igualó la reducción del Mo (VI) del Ác. Asc., seguido del extracto acetato de etilo con un 93 %, el extracto hexánico lo redujo un 26 % y el aceite de maíz solo un 10 % en comparación con el 100 % del Ác. Asc.

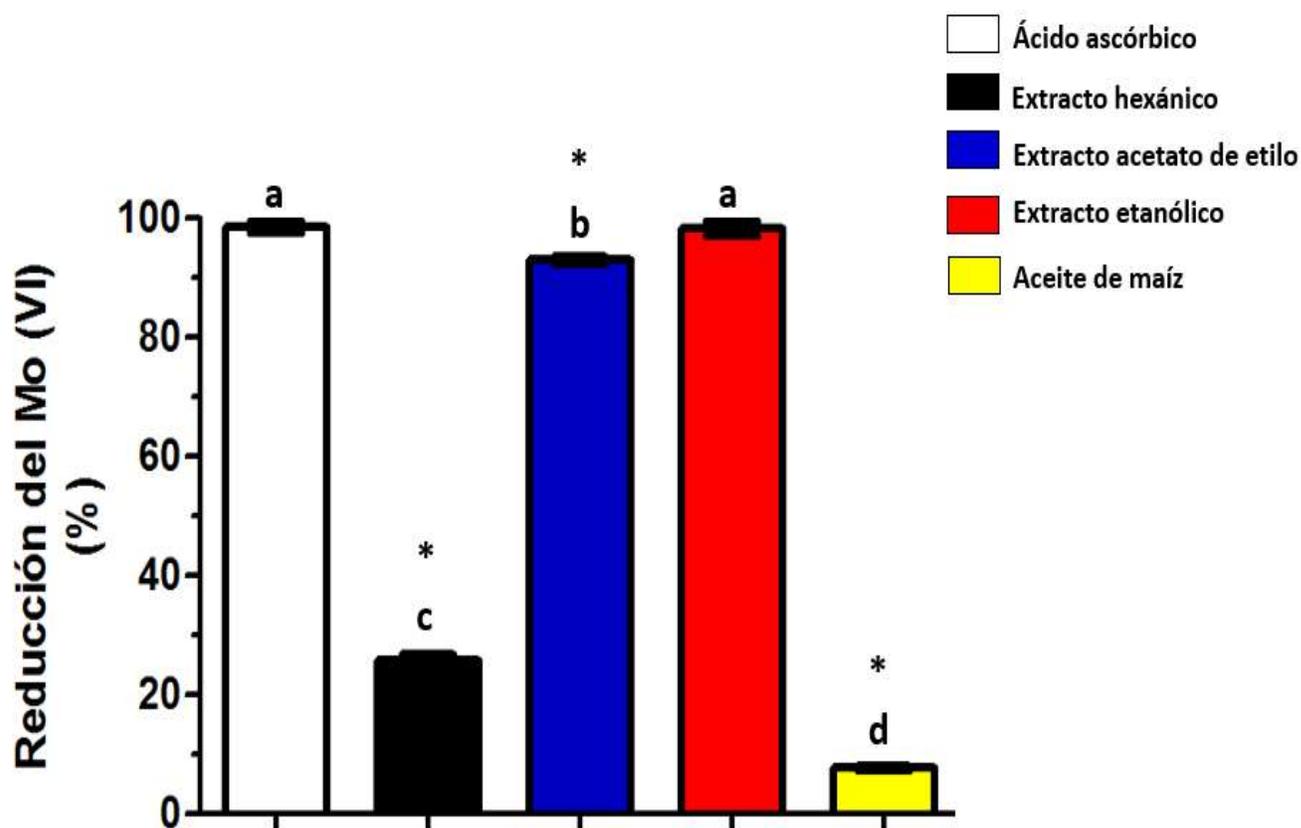


Figura 26. Porcentaje de reducción del molibdeno (VI). Datos expresados como la media \pm la S.D. de 3 experimentos independientes por triplicado y se utilizó la prueba estadística *t*-Student. * $p < 0.05$ vs ácido ascórbico (Ác. asc). Se tomó como 100 % la actividad del Ác. asc.

Los 3 extractos mostraron poca actividad de reducción del ión Fe^{+3} (Figura 27), el extracto hexánico un 9 %, el extracto acetato de etilo 17 % y el extracto etanólico fue el que mayormente lo redujo con un 25 %, mientras que el aceite de maíz un 3 % observándose una marcada diferencia significativa respecto a su control positivo (Ác. asc) que se tomó como 100 % de reducción del Fe^{+3} .

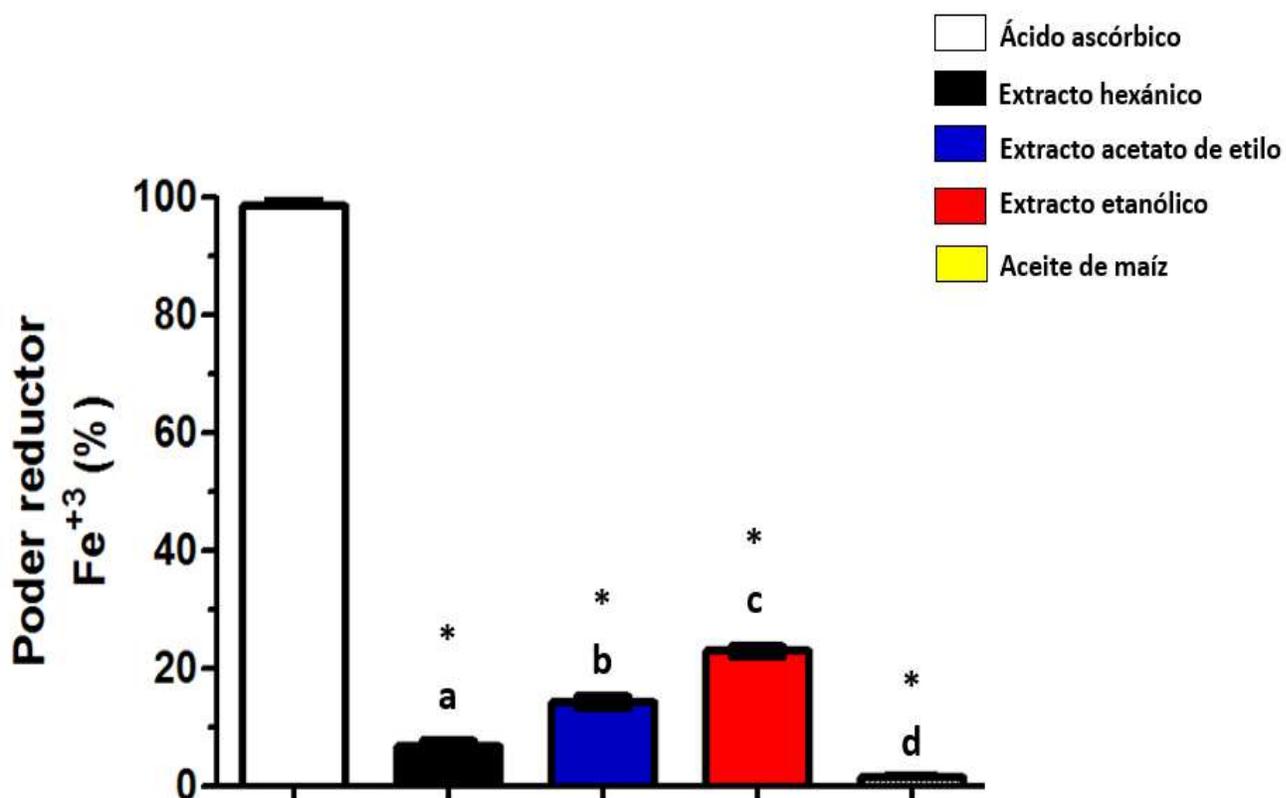


Figura 27. Poder reductor del Fe^{+3} . Datos expresados como la media \pm la S.D. de 3 experimentos independientes por triplicado y se utilizó la prueba estadística *t*-Student. * $p < 0.05$ vs ácido ascórbico. Se tomó como 100 % la actividad del Ác. asc.

Los resultados de antilipoperoxidación de los extractos se representan en la figura 28, en donde el extracto hexánico inhibió un 83 % la lipoperoxidación, el extracto acetato de etilo un 52 %, el extracto etanólico un 78 % y el aceite de maíz un 48 %, siendo significativamente diferentes y menores que el ácido ascórbico, siendo los extractos hexánico y etanólico los que mayor inhibición de la lipoperoxidación presentaron.

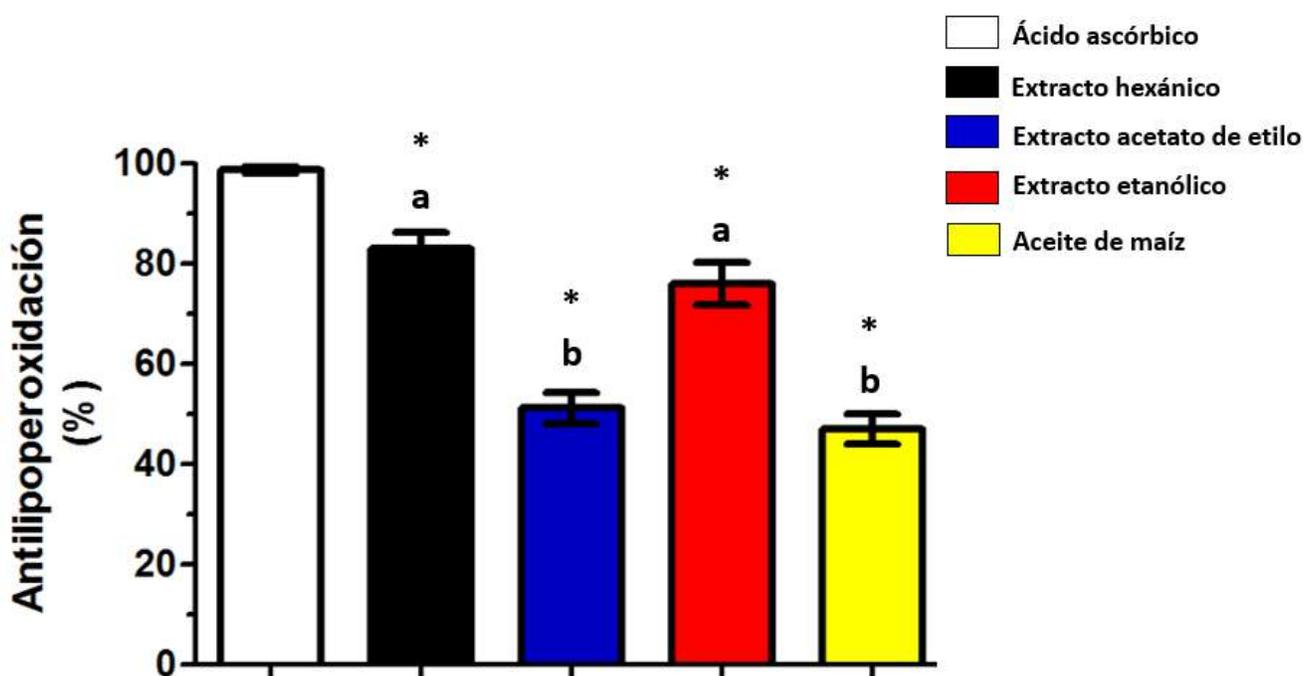


Figura 28. Antilipoperoxidación. Datos expresados como la media \pm la S.D. de 3 experimentos independientes por triplicado y se utilizó la prueba estadística *t*-Student. * $p < 0.05$ vs ácido ascórbico (Ác. asc). Se tomó como 100 % la actividad del Ác. asc.

Parámetros serológicos de daño renal y lípidos en ratas administradas con los extractos de *Justicia spicigera*.

Tabla 9. Pruebas serológicas (glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos) de ratas administradas durante 30 días con aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera*. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. n=5-8. * $p < 0.05$ Normoglucémico vs Diabético, + $p < 0.05$ Diabético control vs Diabético tratado. Valores normales tomados de Suckow *et al.*, 2006; León-Goñi *et al.*, 2011.; Giknis y Clifford, 2008; Sharp y Villano, 2013.

Prueba	Valores normales en ratas	Control (Aceite de maíz)		Extracto hexánico	
		N	D	N	D
mg / dL					
Glucosa	65 - 110	71 \pm 8	372 \pm 30 *	77 \pm 10	213 \pm 33 * +
Urea	15 - 45	30 \pm 6	55 \pm 10 *	27 \pm 8	53 \pm 11 *
Creatinina	0.3 – 1.0	0.53 \pm 0.06	0.8 \pm 0.08 *	0.55 \pm 0.09	0.74 \pm 0.09
Colesterol	37 - 85	68 \pm 10	82 \pm 9	53 \pm 6	52 \pm 9 +
Triglicéridos	30 - 100	77 \pm 8	117 \pm 6 *	69 \pm 7	77 \pm 9 +

Los valores de glucemia de los grupos administrados con aceite de maíz y el extracto hexánico son presentados en la tabla 9; en el primer parámetro (Glucosa), el grupo normoglucémico administrado con aceite de maíz presentó glucemias de 71 \pm 8 mg/dL y el administrado con el extracto hexánico de 77 \pm 10 mg/dL, mientras que el grupo diabético administrado con aceite de maíz de 372 \pm 30 mg/dL y el diabético tratado de 213 \pm 33 mg/dL.

En el parámetro de urea, no hubo cambios en la administración del extracto hexánico ya que los grupos normoglucémicos presentaron concentraciones promedio de 30 mg/dL y los grupos diabéticos de 55 mg/dL el control y el diabético de 53 mg/dL, lo que indica que el extracto en los grupos normoglucémicos no hay alteración en este parámetro y en los grupos diabéticos se ve reflejado el daño renal a nivel glomerular, ya que hay un aumento en las concentraciones de urea en ambos grupos diabéticos y el extracto no modifica este parámetro en la condición diabética.

Respecto a la creatinina, el grupo normoglucémico control (aceite de maíz) presentó concentraciones de 0.53 mg/dL y el grupo diabético control de 0.8 mg/dL; el grupo diabético tratado con el extracto hexánico de 0.75 mg/dL, estando aumentados en ambos grupos diabéticos (sin revasar el valor normal) dado que ya está presente un daño renal, porque los glomérulos no filtran bien la sangre escapándose estas moléculas.

Los resultados obtenidos de colesterol total, el grupo normoglucémico control presentó concentraciones de 68 mg/dL y con una tendencia a disminuir el colesterol total en el grupo normoglucémico tratado con el extracto hexánico siendo de 53 mg/dL y los grupos diabéticos, en el control administrado con aceite de maíz se observa una ligera tendencia a aumentar las concentraciones, mientras que la administración del extracto hexánico en la condición diabética redujo de manera significativa las concentraciones de colesterol total hasta 52 mg/dL, teniendo un efecto hipocolestrerolémico.

En el parámetro de triglicéridos, los grupos normoglucémicos (control y tratado con el extracto hexánico) están dentro de lo normal 77 mg/dL y 69 mg/dL respectivamente, por lo que la administración del extracto hexánico no modifica este parámetro en normoglucémicos. Respecto a los grupos diabéticos, en la condición diabética control, se encuentran aumentados superando el rango normal (hasta 100 mg/dL) presentándose de 117 mg/dL, a diferencia del grupo diabético tratado con el extracto hexánico, que redujo de manera significativa las concentraciones de triglicéridos hasta el grado de normalizarla a 77 mg/dL, teniendo un efecto hipotrigliceridémico. Como

la administración del extracto hexánico presentó efecto hipocolesterolémico e hipotrigliceridémico se dice que tiene efecto hipolipidémico.

Tabla 10. Pruebas serológicas (glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos) de ratas administradas durante 30 días con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera*. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. $n=5-8$. * $p<0.05$ Normoglucémico vs Diabético, + $p<0.05$ Diabético control vs Diabético tratado. Valores normales tomados de Suckow *et al.*, 2006; León-Goñi *et al.*, 2011.; Giknis y Clifford, 2008; Sharp y Villano, 2013.

Prueba	Valores normales en ratas	Control (DMSO)		Extracto acetato de etilo		Extracto etanólico	
		N	D	N	D	N	D
mg / dL							
Glucosa	65 - 110	96 \pm 8	422 \pm 22 *	72 \pm 5	204 \pm 15 * +	70 \pm 9	180 \pm 25 * +
Urea	15 - 45	31 \pm 6	54 \pm 9 *	37 \pm 6	52 \pm 5 *	39 \pm 9	47 \pm 8
Creatinina	0.3 - 1.0	0.4 \pm 0.04	0.75 \pm 0.07 *	0.42 \pm 0.06	0.78 \pm 0.08 *	0.53 \pm 0.06	0.64 \pm 0.05
Colesterol	37 - 85	74 \pm 6	70 \pm 8	65 \pm 7	64 \pm 8	75 \pm 10	71 \pm 8
Triglicéridos	30 - 100	85 \pm 7	161 \pm 15 *	82 \pm 6	88 \pm 10 +	79 \pm 10	95 \pm 12 +

Para las pruebas serológicas de glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos de las ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera*. En las concentraciones de glucemia, el grupo normoglucémico control

presentó un promedio de 96 mg/dL, mientras que los grupos normoglucémicos administrados con los extractos acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* presentaron glucemias de 72 y 70 mg/dL respectivamente. En los grupos diabéticos, el control al final del tratamiento presentó concentraciones de 422 mg/dL, mientras que los grupos tratados con los extractos acetato de etilo y etanólico mostraron glucemias de 204 mg/dL y 180 mg/dL, reflejando un efecto hipoglucémico pero sin llegar a normalizar.

Respecto al parámetro de urea, los grupos normoglucémicos presentaron concentraciones de 31 mg/dL el grupo control, de 37 y de 39 mg/dL los tratados con el extracto acetato de etilo y etanólico respectivamente, sin ser estadísticamente diferentes entre ellos. En la condición diabética el grupo control refleja que ya hay un daño a nivel glomerular ya que superan los valores normales con 54 mg/dL, el grupo diabético tratado con el extracto acetato de etilo de 52 mg/dL y el etanólico de 47 mg/dL, en donde los extractos no tienen efecto en este parámetro, sin embargo se observa una tendencia a disminuir la concentración de urea sérica en el grupo diabético administrado con el extracto etanólico.

Las concentraciones de creatinina en los grupos normoglucémicos osciló en 0.4 y 0.5 mg/dL, mientras que en los grupos diabéticos el control 0.75 mg/dL, el tratado con el extracto acetato de etilo 0.78 mg/dL y el etanólico 0.64 mg/dL, no siendo estadísticamente diferentes entre ellos.

En el análisis de los lípidos séricos (colesterol y triglicéridos), en colesterol no hubo diferencias significativas en los grupos de ambas condiciones al oscilar entre 64 mg/dL y 75 mg/dL. Sin embargo, en los triglicéridos, los grupos normoglucémicos control presentó concentraciones de 85 mg/dL, el normoglucémico tratado con el extracto acetato de etilo de 82 mg/dL y el grupo tratado con el extracto etanólico de 79 mg/dL, en los cuales no hay alteración en este parámetro. Sin embargo, en el grupo diabético control, como ya se tiene bien reportado los altos niveles de triglicéridos en diabetes tipo 1, el grupo presentó concentraciones de 161 mg/dL, en los grupos diabéticos tratados con el extracto acetato de etilo y etanólico tuvieron un efecto hipotrigliceridémico, ya que son significativamente

diferentes contra el control, al estar en 88 mg/dL el tratado con el extracto acetato de etilo y de 95 mg/dL el tratado con el extracto etanólico.

Actividad de moléculas antioxidantes en riñón y cerebro de ratas diabéticas administradas con los extractos de *Justicia spicigera*.

Tabla 11. Actividad de la superóxido dismutasa en mitocondrias de riñón y cerebro de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera* durante 30 días. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba *t*-Student. n=5-8.

Órgano	Control aceite de maíz		Extracto hexánico	
	N	D	N	D
	(U/mg de proteína)			
CEREBRO	27 \pm 6	16 \pm 8	25 \pm 7	15 \pm 8
RIÑÓN	35 \pm 6	32 \pm 3	31 \pm 4	35 \pm 9

La tabla 11 presenta los resultados de la actividad de la SOD en mitocondrias de riñón y cerebro de las ratas control (aceite de maíz) y las tratadas con el extracto hexánico. La actividad de la SOD en las mitocondrias de cerebro en el grupo normoglucémico control fue de 27 U/mg de proteína y el extracto no tiene efecto sobre ésta enzima al estar en 25 U/mg de proteína, mientras que los grupos diabéticos, se observa una tendencia a estar disminuida su actividad en los diabéticos, pero sin llegar a ser diferente contra los normoglucémicos. En las mitocondrias de riñón no se observan diferencias entre los 4 grupos al oscilar entre 31 y 35 U/mg de proteína. El extracto hexánico no tiene efecto en la actividad de la SOD en mitocondrias de riñón y cerebro de ratas diabéticas.

Tabla 12. Actividad de la superóxido dismutasa en mitocondrias de riñón y cerebro de ratas administradas con el DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* durante 30 días. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. DMSO: Dimetilsulfóxido. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. n=5-8. * $p < 0.05$ Normoglucémico control vs Diabético control.

Órgano	Control DMSO		Extracto acetato de etilo		Extracto etanólico	
	N	D	N	D	N	D
	(U/mg de proteína)					
CEREBRO	24 \pm 8	13 \pm 7	19 \pm 6	14 \pm 5	23 \pm 6	18 \pm 6
RIÑÓN	32 \pm 6	17 \pm 5 *	24 \pm 7	19 \pm 9	26 \pm 8	28 \pm 7

Los resultados de la actividad de la SOD en mitocondrias de cerebro y riñón de las ratas control administradas con DMSO y las tratadas con el extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* se presentan en la tabla 12, la actividad de la SOD de las mitocondrias de cerebro, las normoglucémicas control presentaron actividad de 24 U/mg de proteína, las tratadas con el extracto acetato de etilo 19 U/mg de proteína y las tratadas con el extracto etanólico de 23 U/mg de proteína; y en los grupos diabéticos hay una tendencia a disminuir la actividad de la SOD, ya que está en 13 U/mg de proteína la del grupo control, de 14 U/mg de proteína la del grupo diabético tratado con el extracto acetato de etilo y de 18 U/mg de proteína la del grupo diabético tratado con el extracto acetato de etilo.

En la actividad de la SOD de las mitocondrias de riñón, en los grupos normoglucémicos, el control presentó actividad de 32 U/mg de proteína, el tratado con el extracto acetato de etilo de 24 U/mg de proteína y el tratado con el extracto etanólico de 26 U/mg de proteína, no siendo diferentes estadísticamente entre ellos. Sin embargo, los grupos diabéticos, el grupo control se encuentra disminuida la actividad de la SOD de manera significativa al estar en 17 U/mg de proteína, mientras que los grupos tratados

con el extracto acetato de etilo de 19 U/mg de proteína y el tratado con el extracto etanólico restableció la actividad de esta enzima al presentarse de 28 U/mg de proteína.

Tabla 13. Actividad de la catalasa de riñón y cerebro de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera* durante 30 días. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. $n=5-8$. * $p<0.05$ Normoglucémico vs Diabético.

Órgano	Control aceite de maíz		Extracto hexánico	
	N	D	N	D
(μ moles de H_2O_2 consumido / min / mg de proteína)				
CEREBRO	25.5 \pm 0.6	18.4 \pm 0.4 *	23.8 \pm 0.7	19 \pm 0.8 *
RIÑÓN	38.5 \pm 3.7	20.8 \pm 2.8 *	36.5 \pm 2.5	23.8 \pm 2.9 *

En la actividad de la catalasa en el homogenado de cerebro en el grupo control normoglucémico presentó actividad de 25.5 μ moles de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína y en el grupo normoglucémico tratado con el extracto hexánico de 23.8 μ moles de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína, siendo estadísticamente diferentes en comparación con los grupos diabéticos que se encuentra disminuida la actividad en el grupo control estando de 18.4 μ moles de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína y el tratado con el extracto hexánico de 19 μ moles de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína.

Tabla 14. Actividad de la catalasa de riñón y cerebro de ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* durante 30 días. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. n=5-8. * $p < 0.05$ Normoglucémico vs Diabético. + $p < 0.05$ Diabético control vs Diabético tratado.

Órgano	Control DMSO		Extracto acetato de etilo		Extracto etanólico	
	N	D	N	D	N	D
(μ moles de H ₂ O ₂ consumido / min / mg de proteína)						
CEREBRO	20.4 \pm 0.5	15.6 \pm 0.7 *	24 \pm 0.8	19.8 \pm 0.9 * +	23 \pm 0.9	22.3 \pm 0.8 +
RIÑÓN	33.1 \pm 3.8	17.7 \pm 2.9 *	32.4 \pm 1.8	24.5 \pm 1.7 * +	29.7 \pm 3.4	28.3 \pm 2.7 +

La actividad de la catalasa en el cerebro fue de 20.4 μ moles de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína y los grupos tratados con el extracto acetato de etilo y etanólico mostraron una actividad de 24 y 23 μ moles de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína respectivamente. En los grupos diabéticos se encuentra disminuida de manera significativa, en el grupo control 15.6 μ moles de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína, sin embargo en los grupos diabéticos tratados con el extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* la actividad de esta enzima se encuentra reestablecida al estar de 19.8 y de 22.3 μ moles de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína respectivamente.

Tabla 15. Concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de cerebro de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera* durante 30 días. N: Normoglucémico, D: Diabético. Los datos representan la Media ± S.D. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student. n=5-8.

	Control		Extracto	
	aceite de maíz		hexánico	
	N	D	N	D
(µmoles/mg de proteína)				
GSH_T	25 ± 4	24 ± 12	27 ± 5	30 ± 6
GSH	17 ± 5	15 ± 4	17 ± 5	21 ± 8
GSSG	8 ± 4	9 ± 5	10 ± 5	9 ± 6
GSH/GSSG	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.3	2.3 ± 0.4

La tabla 15 muestra los resultados de las concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de cerebro de ratas administradas con el aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera*, en la cual se observa que en ambos grupos normoglucémicos, la concentración de GSH_T no hay diferencias significativas al estar de 25 µmoles/mg de proteína en el control y de 27 µmoles/mg de proteína en el tratado con el extracto hexánico. En los grupos diabéticos, el control presentó concentración de 24 µmoles/mg de proteína y el grupo tratado con el extracto etanólico de 30 µmoles/mg de proteína. En el GSH no hay diferencias significativas en los 4 grupos ya que oscilaron entre 15 y 21

µmoles/mg de proteína. El extracto hexánico no ejerce efectos sobre el GSH. En el GSSG tampoco hay cambios, ya que oscilaron entre 8 y 10 µmoles/mg de proteína, por lo tanto tampoco se ven cambios en la relación de reducido/oxidado.

Tabla 16. Concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de cerebro de ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* durante 30 días. N: Normoglucémico, D: Diabético. Los datos representan la Media ± S.D. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. n=5-8. * *p*<0.05 Normoglucémico vs Diabético. + *p*<0.05 Diabético control vs Diabético tratado.

	Control		Extracto		Extracto	
	DMSO		acetato de etilo		etanólico	
	N	D	N	D	N	D
	(µmoles/mg de proteína)					
GSH_T	47 ± 12	23 ± 8 *	58 ± 17	56 ± 19 ⁺	55 ± 15	46 ± 10 ⁺
GSH	29 ± 4	10 ± 9 *	27 ± 4	26 ± 7 ⁺	28 ± 8	30 ± 6 ⁺
GSSG	18 ± 6	13 ± 9	20 ± 8	20 ± 5	27 ± 3	17 ± 5
GSH/GSSG	1.6 ± 0.3	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.1	1.03 ± 0.2	1.7 ± 0.2

Las concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de cerebro de ratas administradas con el aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera*, en la cual, el GSH_T del grupo normoglucémico control presentó 47 µmoles/mg de proteína, el tratado con el extracto

acetato de etilo de 58 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína y el tratado con el extracto etanólico de 55 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína. En los grupos diabéticos, el control se encuentra disminuido de manera significativa al estar en 23 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína y los grupos diabéticos tratados con los extractos acetato de etilo y etanólico reestablecen las concentraciones de GSH_T al estar en 56 y 46 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína respectivamente. En las concentraciones de GSH los grupos normoglucémicos presentaron 29, 27 y 28 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína (control, acetato de etilo y etanólico respectivamente) no habiendo diferencias entre ellos. Sin embargo, en los grupos diabéticos, las concentraciones de GSH se ven disminuidas en el control al estar en 10 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína y los grupos tratados con los extractos acetato de etilo y etanólico reestablecen esta concentración al estar en 26 y 30 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína. En el parámetro de GSSG, no hay diferencias estadísticas entre estos datos, ya que oscilaron entre 13 y 27 $\mu\text{moles/mg}$ de proteína. Así es que la relación reducido/oxidado en los grupos normoglucémicos, el control presentó relación de 1.6, el grupo diabético administrado con acetato de etilo 1.4 y el administrado con el etanólico de 1.03. En la condición diabética, el control se ve disminuido de manera significativa presentando relación de 0.7, el grupo administrado con el extracto acetato de etilo y etanólico mejoraron considerablemente la relación al estar de 1.3 y 1.7 respectivamente (Tabla 16).

Tabla 17. Concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de riñón de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera* durante 30 días. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student. n=5-8. * $p < 0.05$ Normoglucémico vs Diabético.

	Control		Extracto	
	aceite de maíz		hexánico	
	N	D	N	D
	(μ moles/mg de proteína)			
GSH_T	25 \pm 4	9 \pm 4 *	16 \pm 6	12 \pm 7
GSH	17 \pm 6	4 \pm 2 *	9 \pm 5	5 \pm 3
GSSG	8 \pm 4	5 \pm 3	7 \pm 3	7 \pm 4
GSH/GSSG	2.1 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1

La tabla 17 presenta las concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de riñón de ratas administradas con aceite de maíz y extracto hexánico de *Justicia spicigera*. En los grupos normoglucémicos las concentraciones de GSH_T en el grupo control fue de 25 μ moles/mg de proteína y el tratado con el extracto hexánico de 16 μ moles/mg de proteína y en la condición diabética se encuentra disminuido de manera significativa en el grupo control al estar en 9 μ moles/mg de proteína y en el grupo diabético tratado lo presentó de 12 μ moles/mg de proteína. En el parámetro de GSH, la concentración del grupo normoglucémico control fue de 17 μ moles/mg de proteína mientras que el grupo tratado con el extracto hexánico fue de 9 μ moles/mg de proteína, en los grupos

diabéticos, la concentración del control fue de 4 μ moles/mg de proteína, siendo significativamente diferente al estar disminuido, mientras que el grupo tratado la presentó de 5 μ moles/mg de proteína. En el parámetro de GSSG, no hubo diferencias entre los 4 grupos ya que oscilaron entre 5 y 8 μ moles/mg de proteína. Por lo que la mejor relación GSH/GSSG la presentó el grupo normoglucémico control siendo de 2.1, seguido del normoglucémico tratado con 1.3, el grupo control diabético de 0.8 y el diabético tratado con 0.7, no siendo diferentes entre éstos 2.

Tabla 18. Concentraciones de glutatión total (GSH_T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y relación reducido/oxidado (GSH/GSSG) en mitocondrias de riñón de ratas administradas con DMSO, extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* durante 30 días. Los datos representan la Media \pm S.D. N: Normoglucémico, D: Diabético. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student. n=5-8.

	Control		Extracto		Extracto	
	DMSO		acetato de etilo		etanólico	
	N	D	N	D	N	D
	(μ moles/mg de proteína)					
GSH_T	13 \pm 5	12 \pm 5	20 \pm 6	20 \pm 5	16 \pm 6	12 \pm 4
GSH	11 \pm 4	5 \pm 4	16 \pm 5	9 \pm 3	9 \pm 4	8 \pm 4
GSSG	4 \pm 2	6 \pm 3	4 \pm 2	11 \pm 3	7 \pm 3	4 \pm 2
GSH/GSSG	2.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	4 \pm 0.5	0.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	2 \pm 0.1

Las concentraciones de GSH_T (tabla 18) en los grupos normoglucémicos el control fue de 13 μ moles/mg de proteína, el tratado con el extracto acetato de etilo de 20 μ moles/mg de proteína y el administrado con el extracto etanólico fue de 16 μ moles/mg de proteína, sin ser estadísticamente diferente en ellos. En el parámetro de GSH, los

grupos normoglucémicos, el control fue de 11 μ moles/mg de proteína, mientras que en el tratado con el extracto acetato de etilo la presentó de 16 μ moles/mg de proteína y de 9 μ moles/mg de proteína el tratado con el extracto etanólico. En el mismo parámetro, los grupos diabéticos no hubo diferencias significativas entre ellos al estar de 5 μ moles/mg de proteína en el control, de 9 μ moles/mg de proteína el tratado con el extracto acetato de etilo y de 8 μ moles/mg de proteína el tratado con el extracto etanólico. En el GSSG, los grupos normoglucémicos: el control, su concentración fue de 4 μ moles/mg de proteína al igual que el tratado con el extracto acetato de etilo y de 7 μ moles/mg de proteína en el tratado con el extracto etanólico. Mientras que en los grupos diabéticos, el control fue de 6 μ moles/mg de proteína, el administrado con el extracto acetato de etilo se ve aumentado a 11 μ moles/mg de proteína y el tratado con el extracto etanólico fue de 4 μ moles/mg de proteína. Por lo que la relación GSH/GSSG en los grupos normoglucémicos: el control fue de 2.7, en el tratado con el extracto acetato de etilo de 4.0 y el tratado con el extracto etanólico de 1.3. La relación de los grupos diabéticos: En el control y en el administrado con el extracto acetato de etilo fue de 0.8, mientras que el tratado con el etanólico fue de 2. Por lo que el extracto etanólico es la mejor elección en la condición diabética, ya que presenta mejor relación GSH/GSSG.

El porcentaje de rendimiento de cada extracto se calculó dividiendo el peso (g) de lo que se obtuvo de extracto entre el peso de las hojas frescas por 100. Obteniéndose mayor rendimiento del extracto etanólico (0.26%), indicando que hay mayor presencia de compuestos polares, seguido del acetato de etilo (0.11 %) y por último el extracto hexánico (0.005 %).



Figura 29. Rendimiento de los extractos de las hojas de *Justicia spicigera* (30 g de hoja fresca).

9. DISCUSIÓN

La hiperglucemia es la característica principal de la diabetes y se asocia directamente con el desarrollo de sus complicaciones, esto debido a que la hiperglucemia ocasiona una elevada producción de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial (Brownlee, 2005). El estrés oxidativo es la causa de algunas complicaciones como la nefropatía, neuropatías, entre otras y se ha visto que al controlar la producción de especies reactivas de oxígeno, disminuye el estrés oxidativo y se normalizan las vías metabólicas alteradas (Brownlee, 2001). La diabetes es una enfermedad metabólica crónica-degenerativa, de modo que su repercusión de quien la padece varía conforme avanza la enfermedad (Rizza, 2006). Los gastos involucrados en el manejo y cuidado de la diabetes afectan a los sistemas de salud, a los individuos y a la economía de su familia. La expectativa y calidad de vida pueden resultar muy deterioradas por la diabetes (Atlas de diabetes, 2015). Los gastos médicos de una persona con diabetes son hasta 5 veces más altos que los de una persona sin la enfermedad, lo que pone en duda si la persona diabética será capaz de solventar los gastos generados por su enfermedad o si en algún momento se verá obligada a dejar el tratamiento farmacológico. Cuando no se tienen los cuidados necesarios durante la enfermedad, los pacientes diabéticos corren más riesgo de presentar complicaciones microvasculares nefropatía, neuropatía, retinopatía y dentro de las macrovasculares: Infarto al miocardio o accidente cerebrovascular (Atlas de diabetes, 2015).

En la medicina tradicional mexicana, las personas recurren a las plantas con el fin de aliviar sus padecimientos, esto por ser una alternativa sencilla, fácil de obtener y económica. Un gran número de plantas medicinales han demostrado tener efectos benéficos sobre las enfermedades cardiovasculares y la diabetes a través de efectos como hipoglucémicos, hipolipidémicos, antioxidantes y antiinflamatorios. Las plantas son una fuente de fitoquímicos activos que pueden servir como guía para el desarrollo de nuevos fármacos más seguros, efectivos y sobre todo económicos (Wang y Ng, 1999). La información etnobotánica mundial reporta que más de 800 plantas pueden ser usadas

para el control de la diabetes, por su actividad hipoglucémica, hipolipidémica o antioxidante, cuando se ingieren de vía oral. Algunas de estas plantas han sido probadas experimentalmente y han demostrado tener efectos positivos en la condición diabética (Udayakumar *et al.*, 2009).

Justicia spicigera es una de las plantas con mayor uso para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay evidencia científica con respecto a las propiedades hipoglucémicas y sus efectos sobre otros parámetros como la urea, la creatinina, el colesterol y los triglicéridos, en relación a los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico. Anteriormente, se demostró que el extracto etanólico de la parte aérea de *Justicia spicigera* presentó efectos hipoglucémico y antioxidante, debido a la presencia del kaempferitrin (Euler y Alam, 1982; Dominguez *et al.*, 1990). Ortiz-Andrade *et al.*, 2012, demostraron que el kaempferitrin es el compuesto más abundante en el extracto etanólico y que su contenido (69.65 mg/g) fue 2.3 veces y 124 veces más altos que los reportados para las plantas medicinales *Bauhinia forti catafi* (hipoglucémica) y *Osmophloeum cinnamomum*, respectivamente (Ferrerres *et al.*, 2012; Rho *et al.*, 2010). Investigaciones han demostrado que las propiedades antioxidantes de las plantas podrían correlacionar con la defensa ante el estrés oxidativo presente en diferentes enfermedades humanas (Chen *et al.*, 2011; Conforti *et al.*, 2008).

Para determinar la actividad antioxidante de las hojas de *Justicia spicigera*, en este trabajo se obtuvieron 3 tipos de extractos de diferente polaridad cada uno (hexano, acetato de etilo y etanol) y se analizaron frente a cuatro diferentes pruebas *in vitro* (fundamentadas en diferentes mecanismos de reacción). Como control positivo se usó el ácido ascórbico al 0.03%, ya que se ha reportado su efecto antioxidante y para compararse con la capacidad antioxidante de los extractos. También, dichos extractos se probaron *in vivo* en un modelo de diabetes tipo 1 en ratas inducidas con estreptozotocina (50 mg/kg de peso).

Entre los compuestos más relacionados por presentar actividad antioxidante se encuentra el kaempferitrín y el triamnósido de campferol, que se han aislado de las hojas de *Justicia spicigera* (Peña-Agüero, 2010). Por lo cual es necesario determinar la

concentración de estos compuestos en los tres tipos de extractos utilizados, con el fin de conocer si la actividad antioxidante observada se debe específicamente a uno de los compuestos presentes o es por un efecto sinérgico entre los compuestos presentes en las hojas. La presencia de más compuestos antioxidantes no garantiza su mismo efecto *in vivo*, ya que las sustancias presentes en los tres tipos de extractos pueden interactuar de manera diferente dentro de un organismo, además se debe considerar que hay variación en la cantidad y calidad de los compuestos presentes dependiendo del lugar de recolección de la planta y el tipo de preparación que se utilizó. Es importante mencionar que las características antioxidantes dependen de la concentración del extracto y del medio de maceración.

Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo reportaron que en el extracto clorofórmico de la parte aérea de *Justicia spicigera* a una concentración de 1 %, se iguala la inhibición de la lipoperoxidación al 100 % de la presentada por el ácido ascórbico y que reduce un 65 % el Mo (VI) y en el poder reductor el extracto clorofórmico reduce un 23 % el Fe⁺³ (Tesis de licenciatura Katia García Estrada, 2016). También en nuestro grupo de trabajo, se comprobó el efecto antihipertensivo del extracto clorofórmico de *Justicia spicigera* en ratas inducidas con L-NAME (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Como se mencionó, la característica principal de la diabetes es la hiperglucemia, por lo tanto habrá una elevada oxidación de la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, lo que producirá una elevación de equivalentes reductores NADH y FADH₂ que pasarán sus electrones a la CTE. Como respuesta al elevado flujo de electrones a la CTE, se sintetizará NO·. Esta acción trae como consecuencia la acumulación de electrones río arriba de la CTE que fácilmente reaccionan con el oxígeno circundante dando lugar a la formación de O₂· y se producirá estrés oxidativo.

Para su análisis *in vivo*, los extractos fueron administrados a las ratas vía oral, 1 ml de manera diaria durante 30 días a la misma hora por la mañana. La dosis de los extractos utilizados en este estudio fue seleccionada en base a su falta de efectos tóxicos, según se

evaluó en ensayos de toxicidad aguda (Alonso-Castro *et al.*, 2012) por lo que se se prepararon a 100 mg/kg.

Los extractos de las hojas de *Justicia spicigera* no modificaron los signos de la diabetes (polidipsia, polifagia, pérdida de peso corporal) como se muestra en la tabla 8, los grupos diabéticos bebían hasta el triple de lo que los grupos normoglucémicos, al igual que en la ingesta de alimento los diabéticos comían significativamente más que los grupos normoglucémicos. En las gráficas (Figura 23 y 24) se observa que las ratas comienzan con diferente peso corporal debido a que el inicio del tratamiento fue 6 días después de su inducción a la diabetes. Debido a que los compuestos extraídos con el hexano son insolubles en agua y DMSO, se usó el aceite de maíz como disolvente para poder ser administrado via oral a las ratas, por lo que también se trabajó con grupos control y diabético administrados con el aceite de maíz solamente.

En la diabetes existe alteración en el metabolismo de proteínas y lípidos, es por ello que se analizaron los niveles de urea y creatinina, ya que son indicadores de la filtración glomerular. Además, se analizó al colesterol y los triglicéridos en suero al final del tratamiento, ya que en la condición diabética se dañan los glomérulos y aumentan los triglicéridos (Taskinen, 2003). Cuando hay deterioro en la función renal, se ve reflejada en la tasa reducida de filtración glomerular, siendo a la vez un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones macrovasculares (Forbes y Cooper, 2013). Los efectos hipocolesterolémicos e hipotrigliceridémicos se pueden deber a que el hexano arrastra fitocompuestos como terpenos y farnesenos que tienen propiedades hipolipidémicas.

En la tabla 10 se muestran los resultados de las pruebas serológicas (glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos) de ratas administradas durante 30 días con DMSO, extracto acetato de tilo y etanólico de *Justicia spicigera*. Los extractos de acetato de etilo y etanólico disminuyeron de manera significativa la hiperglucemia, pero sin llegar a su valor normal al término del tratamiento; posiblemente por la presencia de lignanos en las hojas y al kaempferitrin como lo reportó Ortiz-Andrade, 2012. El kaempferitrin se ha reportado que ejerce efectos hipoglucémicos *in vitro* e *in vivo* (De Sousa *et al.*, 2004). Por lo tanto, el

efecto hipoglucémico de los extractos de acetato de etilo y etanólico podrían deberse a las altas cantidades de kaempferitrin. Estos resultados sugieren que estos extractos son prometedores para el desarrollo de nuevas terapias contra la hiperglucemia y para prevenir enfermedades vasculares. Los parámetros de urea y creatinina no se ven modificados por la administración de los extractos acetato de etilo y etanólico al estar elevados en los grupos diabéticos, resultados que concuerdan con lo reportado en nuestro equipo de trabajo en el 2013, con la diferencia de que se usó a una concentración de 25 mg/kg de peso. El colesterol (tabla 10) no presentó modificación por la administración de los extractos acetato de etilo y etanólico, sin embargo, presentaron efecto hipotriglicéridémico en la condición diabética, estos resultados difieren de lo reportado por Raya-Farias *et al.*, 2013 donde usaron el extracto etanólico de *Justicia spicigera* a una concentración de 25 mg/kg de peso, concluyendo que no tiene efecto hipotriglicéridémico en ratas diabéticas, pero con la variante que usaron la cuarta parte de la concentración que se usó en el presente proyecto: 100 mg/kg.

Zepulveda-Jiménez *et al.*, (2009) analizaron la parte aérea de *Justicia spicigera* y reportan que los extractos preparados con etanol poseen una mayor actividad antioxidante, mayor cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides, a diferencia de los solventes de menor polaridad, esto apoya a nuestros resultados que el extracto etanólico presentó mayor actividad antioxidante *in vitro*. En la tabla 11 se presentan los resultados de la actividad de la enzima SOD mitocondrial de riñón y cerebro de ratas administradas con el aceite de maíz y con el extracto hexánico de *Justicia spicigera*, ya que se conoce que en la condición diabética, se encuentra disminuida esta enzima (Díaz-Flores *et al.*, 2004). En nuestros resultados, no se observaron diferencias significativas entre los grupos normoglucémicos y diabéticos, pero sí una tendencia a encontrarse disminuida en la condición diabética. En la tabla 12 se muestra la actividad de la SOD mitocondrial, ahora de los grupos administrados con DMSO, extracto acetato de etilo y etanol, en donde solamente se observó esa tendencia de disminución en los grupos diabéticos. Así es que el extracto no tiene efecto sobre la SOD mitocondrial de riñón y cerebro y no existen reportes en los cuales se halla trabajado con estos extractos y probados a nivel mitocondrial.

En la tabla 13 se presenta la actividad de la enzima catalasa en los grupos administrados con el aceite de maíz y el extracto hexánico, se observó que en la condición diabética se encuentra significativamente disminuida en comparación con su grupo normoglucémico en ambos órganos (riñón y cerebro). Esto concuerda con los resultados publicados por Díaz-Flores *et al.* (2004) y Najla *et al.* (2013), ya que los estudios de catalasa se realizan en homogenado de los órganos. Como se muestra en la tabla 14, la actividad de la catalasa en el homogenado de cerebro, en los grupos control diabéticos se encuentra disminuida la actividad de la enzima, sin embargo en los grupos diabéticos tratados con el extracto acetato de etilo y etanólico de *Justicia spicigera* la actividad de esta enzima se encuentra reestablecida a valores normales. En homogenado de riñón, la actividad de la catalasa en el grupo diabético administrado con el extracto etanólico, se encontró reestablecida. Estos datos concuerdan con lo publicado por Najla Hfaiedh *et al.*, en el 2013. Esto puede ser debido a que los extractos, al presentar actividad hipoglucémica, evitan que se sobrecargue la vía del sorbitol dejando disponible el NADPH para ser utilizado por las enzimas antioxidantes que lo requieren y así poder ejercer su acción antioxidante (Díaz-Flores M. *et al.*, 2004). El aumento de la concentración de glucosa genera también el incremento de una vía que produce sorbitol a partir de la reducción de la glucosa (vía de polioles), la acumulación de sorbitol produce incrementos de la osmolaridad intracelular con los consecuentes daños celulares, esta reducción de glucosa a sorbitol se logra con la oxidación de NADPH⁺, reacción que realiza una aldosa reductasa, lo que gasta capacidad reductora antioxidante y genera en la reacción la reducción parcial de oxígeno generando H₂O₂. Pero aun más, la acumulación de sorbitol puede alcanzar altas concentraciones activando una vía que puede convertir el sorbitol en fructosa, a partir de una reacción oxidativa catalizada por la sorbitol deshidrogenasa que forma altas concentraciones de NADH⁺ lo que activa a la enzima NADH oxidasa, que hace perder los electrones del NADH⁺ y produce O₂⁻, generando un círculo vicioso que hace que se gaste poder reductor NADH⁺ y produciendo H₂O₂ y O₂⁻, condicionando un mayor estado oxidativo, menor poder reductor y menor protección antioxidante (Das Evcimen N. y King G., 2012. Hashim Z. y Zarina S. 2012). Disminuyendo la posibilidad de regenerar la forma reducida del glutatión,

generalizando una condición caracterizada por una menor capacidad antioxidante de la célula (Quintanar-Escorza, MA. y Calderón-Salinas, JV., 2009).

El estado intracelular de GSH es un indicador sensible de la salud de la célula completa y de su habilidad para resistir a cambios tóxicos o dañinos. Niveles disminuidos o elevados de GSH en la célula pueden indicar cambios patológicos (Akerboom, T.P. *et al.*, 1981., Nair, S., *et al.*, 1991). Ha sido reportado que la relación GSH/GSSG se encuentra disminuida en ratas tratadas con STZ en comparación con los controles, así mismo, el contenido de MnSOD (enzima antioxidante mitocondrial) es marcadamente más baja en ratas inducidas con STZ, también se observa una incrementada cantidad de peróxido de hidrógeno, indicando en conjunto que la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno consumen los antioxidantes endógenos y suprimen la capacidad antioxidante. El H₂O₂ aumentado está relacionado a la pérdida drástica de GSH, el cual es requerido para activar a la GSH peroxidasa, la enzima destoxicante del H₂O₂ (Mastrocola, R. *et al.*, 2005). No existen reportes científicos a nivel mitocondrial de los extractos usados en este proyecto. En las mitocondrias de cerebro, el que mejor relación GSH/GSSG mostró, fue el grupo diabético administrado con el extracto hexánico con 2.3 ± 0.4 . Los extractos acetato de etilo y etanólico restablecieron la relación GSH/GSSG siendo de 1.3 y 1.7 respectivamente. Por lo tanto, ante la presencia de estrés oxidativo, se da una respuesta de defensa por parte de la mitocondria aumentando las cantidades de glutatión.

10. RESUMEN DE RESULTADOS

Como resumen de resultados, el presente estudio demostró que:

- El extracto etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* es el que mejor actividad antioxidante presentó en las pruebas *in vitro* aplicadas.
- El extracto hexánico de las hojas de *Justicia spicigera* ejerció un efecto hipolipidémico en ratas diabéticas al cabo de 30 días de tratamiento.

- Los extractos acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* presentaron actividad hipoglucémica e hipotrigliceridémica de ratas diabéticas al cabo de 30 días de tratamiento.
- El extracto hexánico de las hojas de *Justicia spicigera* restableció la actividad de la SOD y las concentraciones de GSH_T en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas al cabo de 30 días de tratamiento.
- El extracto acetato de etilo de las hojas de *Justicia spicigera* restableció la actividad de la CAT en homogenado de cerebro y riñón de ratas diabéticas al cabo de 30 días de tratamiento.
- El extracto etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* restableció la actividad de la CAT en homogenado de riñón y cerebro, así como la actividad de la SOD en mitocondrias de riñón y restableció las concentraciones de GSH_T y GSH en mitocondrias de cerebro de ratas diabéticas al cabo de 30 días de tratamiento.

11. CONCLUSIÓN

Los extractos hexánico, acetato de etilo y etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* presentan efectos benéficos a nivel serológico y antioxidante en ratas diabéticas.

12. PERSPECTIVAS

- 1.- Dilucidar los compuestos mayoritarios de cada extracto.
- 2.-Esclarecer el mecanismo a través del cual ejercen su efecto hipoglucémico, hipolipidémico y restaurador de la actividad enzimática.
- 3.- Probar el extracto etanólico de las hojas de *Justicia spicigera* por un periodo de tiempo más largo y en un modelo de diabetes tipo 2.

13. REFERENCIAS

Akerboom, T.P. y Sies, H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77: 373-38.

Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. 2011. From the field into the lab: useful approaches to selecting species base on local knowledge. *Front Pharmacol.* 2: 20.

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

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, D. y K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 127: 183-198.

Ares, G., Barreiro, C. y Gambaro, A. 2010. Evaluation of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: Importance of sensory characteristics. *CyTA-Journal of Food.* 8: 201-207.

Argáez-López, N., Wachter, N.H., Kumate-Rodríguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera- Arce, E., Lozoya, X. 2003. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care.* 8: 2470–2471.

Atlas de la Federación Internacional de Diabetes (FID), 2015, 7ª Edición.

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

Becker, M., Staab, D., y Von, Bergmann, K. 1993. Treat-ment of several familial hipercolesterolemias in lingchildhood with sitosterol and sitostanol. *J Pediatr.* 122: 292-296.

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

Biessels, G. J., Kappelle, A. C., Bravenboer, B., Erkelens, D. W. y Gispen, W. H. 1994. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 37: 643-650.

Biessels, G. J., Van der Heide, L. P., Kamal, A., Bleys, R. L. y Gispen W.H. 2002. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 441: 1-14.

Bloomgarden, Z. T. 2003. Perspectives on the news. Aproaches to cardiovascular disease and its treatment. *Diabetes Care.* 26: 3342-3348.

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

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

Bouic, P. J. 2001. The Role of Phytosterols and Phytosterolins in Immune Modulation: A Review of the Past 10 Years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4: 471-475.

Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabétic complications. *Nature* 414: 813-820.

Brownlee, M. 2005. The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 54(6): 1615-1625.

Cayman Chemical. 2015. DPPH 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazine.
<http://caymanchem.com>

Cardenas-Rodriguez, N., O. N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri. Glutati3n peroxidasa: una familia de enzimas. 2008. 13: 201-217 Radicales libres y estr3s oxidativo, aplicaciones m3dicas. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 636pp

Cartaya, O., y Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características Químicas Y Aplicaciones. Cultivos Tropicales. 22: 5-14.

Castrej3n, V., Carbo, R. y Mart3nez M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de glucosa. *REB.* 26(2): 49-57.

Castillo, R., Huerta, P., Carrasco, R. y Rodrigo, R. 2003. Estr3s oxidativo y da3o renal. *CIMEL.* 8(1), 43-52.

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

Cell Bio labs. 2015. OxiSelect™ Ferric Reducing Antioxidant Power.

Cevallos-Ferriz y Sergio, R. S. 1998. Las plantas con flores. M3xico. Ed. Ciencias. 52-57.

- Cisneros, E. 1995. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev cub Inv Biomed.* 14 (1)
- Côrrea, G. M. y Alcântara, A. F. 2012. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* – a review. *Bras Farmacogn.* 22: 220–238.
- Das Evcimen N, King GL. 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res.* 55(6): 498-510.
- Delaval, E., Perichon, M. y Friguet, B. 2004. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur. J. Biochem.* 271: 4559–4564.
- Devlin, T. M. 2006. Biochemistry. 6a Edición. Edit. Wiley-Liss. U.S.A. Capítulo 1 y 14.
- De Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Silva, F.R. 2004. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J Nat Prod.* 67: 829–832.
- Díaz, H. D. y Burgos, H. L. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA.* 15 (3) 179-189.
- Díaz-Flores *et al.*, 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta médica de México.* 140 (4): 437–447.
- Dixon, R. 2001. Natural Products and Plant Disease Resistance. *Macmillan Magazines Ltd. Nature.* 411: 843-847.
- Domínguez, X. A., Achenbach, H., González, Ch. y Ferré-D Amore, A. R. 1990. Estudio químico del “muñile” (*Justicia spicigera*). *Rev Latinoam Quím.* 21: 142-143.
- Dringen, R., Gutterer, J. M. y Hirrlinger, J. 2000. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochemistry.* 267: 4912-4916.
- Duchen, M.R. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine.* 25 (4): 365-451.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F. y S. M. Nabavi. 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. *Pharmacogn Res.* 1: 435-439.

Esquivel-Gutierrez, E.R., Noriega-Cisneros, R., Arellano-Plaza, M., Ibarra-Barajas, M., Salgado-Garciglia, R. y Saavedra-Molina, A. 2013. Antihypertensive effect of *Justicia spicigera* in L-name-induced hypertensive rats. *Farmacologyonline*. 2:99-106.

Euler, K. L. y Alam, M. 1982. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *J Nat Prod*. 45: 220-221.

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

Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112

Gerber, G. S. 2002. Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Curr Urol Rep*. 3: 285-291.

Giknis, M., Clifford, C. B. 2008. Clinical laboratory parameters for CrI: WI (Han). *Charles River: accelerating drug development exactly*. 1-17.

Gómez, M. A., Scienz, M. T., García, M. D. y Fernández, M. A. 1999. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Z Naturforsch*. 54: 937-941.

Gómez-Quiroz, L. E. y Cuevas, D. B. 2008. Superóxido dismutasa. Radicales Libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*, Edición: 1. 11: 1-13.

González, M. E., Rojas, A.E., Hernández, C. y Camarillo, A. L. 2013. Manual de Prácticas Química Clínica. Amateditorial.

González, F. 2015. Pruebas de Función Renal. Departamento de Pediatría, Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo". Caracas, Venezuela. 1-12.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. y David, M., M. *J Biol Chem*. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. 177(2):751-66

Green, K., Brand, M. D. y Murphy M. P. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53: 110-118.

Grundey, S. M., Benjamin, I. J., Burke, G. L., Chaint, A., Eckel, R. H., Howard, B. W., Mitch, W., Smith, S. C. y Sowers, J. R. 1999. Diabetes and Cardiovascular Disease A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 100: 1134-1146.

Guyton, A.C. y Hall, J. E. 2012. Tratado de fisiología médica. 12ª Edición. Buscar biblio.

Hashim Z, Zarina S. 2012. Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes. *J Diabetes Complication*. 26(4): 275-279.

Hertog, M. G., Van Poppel, G. P. y Verhoeven, D. 1997. Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford. Clarendon Press. 319-329.

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

Huang, D., Ou, B. y R. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agric. and Food chem*. 53: 1841-1856.

Huerta, C., 1997. La herbolaria: mito o realidad. *CONABIO. Biodiversitas* 12: 1-7.

Hunt, L. M., Arar, N. H. y Akana, L. L. 2000. Herbs, prayer, and insulin: use of medicinal and alternative treatments by a group of Mexican American diabetes patients. *J Fam Pract*. 49: 216-23.

Kaewpibonn, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Svasti, J. y W. Assavalapsakul. 2012. Studies of the “in vitro” cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC Complement and Alternat Med*. 12: 217-224.

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

Katia Cecilia García Estrada. 2016. Tesis de licenciatura de químico Farmacobiología. *Determinación de la actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la planta Justicia spicigera*.

Kim, J., Shon, E., Kim, C. S. y Kim, J. S. 2012. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin. *Exp Diabetes Res*. 2012: 210821.

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

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

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

Kumaran, A. y J. R. Karunakaran. 2007. "in vitro" antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT Food Sci. and Tech.* 40: 344-352.

Lehninger, A. L. 1995. *Bioquímica*. 2ª Edición. Edit. Omega. Barcelona. Capítulo 35.

Lee, J. Y., H. wang, W. I. y S. T. Lim. 2004. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.* 93: 409-415.

Loewy, A. G. y Siekevits, P. 1983. *Estructura y función celular*. 2ª. Edición. Edit. CECSA. México. Capítulo 13.

López, P., Cubillos, L. A, Chinchilla, M. A, Acevedo, I, C. 2001. Endotelio Célula generadora de radicales libres. *Acta Med Colomb.* 26(4): 166-168

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

Lozoya, X., 1994. Two decades of Mexican ethnobotany and research on plant derived drugs. In *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. New York: Wiley.

Magalhães, L., Segundo, M. Reis, S. y J. Lima. 2008. Methodological aspects about "in vitro" evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta.* 613: 1-19.

Mann, J. I. 2002. Diet and risk of coronary heart disease and tipe 2 diabetes. *Lanset.* 360: 783-789.

Manschot, S. M. 2006. *Diabetic encephalopathy: a cerebrovascular disorder?* Edit. Utrecht University.

Martin K. W. y E. Ernst. 2003. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chemother.* 51: 241-246.

Martínez, M. 1992. *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas. Sexta edición. México.

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

Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinatto, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M. y Boccuzzi, G. 2005. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J. Endocrinol.* 187: 37-44.

Mathews, C.K. y Van Holde, K.E. 2001. Bioquímica. 2ªEdición. Edit. McGraw-Hill Interamericana. España. Capítulo 23.

Matuz-Mares, D., Guinzberg, R., Riveros-Rosas, H. y Zentella de Piña, M. 2005. Movilización de glutatión total (GSHT) en hepatocitos aislados. Memorias del XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad de Bioquímica A.C.

Minotti, G. y Aust, D. 1987. The role iron in the initiation of the lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*. 44: 191-208.

Mitchel, P. 1961. Coupling of phosphorylation electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191: 144- 148.

Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *J Biochem*. 417: 1-13.

Musen, G., Lyoo, I. K. y Sparks, C. R. 2006. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes*. 55: 326– 333.

Nair, S., Singh, S.V. y Krishan, A. 1991. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry*. 12: 336- 342.

Najla H. faiedh, Sakria M., barki, Hichem A. limi, Jean Claude Murat y Abdelfattah Elfeki. 2013. Diabetes-Induced Damages in Rat Kidney and Brain and Protective Effects of Natural Antioxidants. *Food and Nutrition Sciences*. 4:436-444.

National Center for Biotechnology Information, U.S. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.

Noriega-Cisneros, R., Ortíz-Ávila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I. y Saavedra-Molina, A. 2012. Hypolipidemic activity of *Eringium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Res Int*. 2012: 603-501.

O'Bryan, G. T. y Hostetter, T. H. 1997. The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 17(2): 93 -100.

Ohkawa, M., Ohisi, N. y K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*. 95: 351-358.

Olorunnisola, O, S., Bradley, G. y Afolayan, A. J. 2012. Protective effect of *Tulbaghia violácea* Harv. on aortic pathology, tissue antioxidant enzymes and liver damage in diet-induced atherosclerotic rats. *Int J Mol Sci*. 13(10): 12747-60.

OMS World Health Organization. 1999. Definition, Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.

Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, R. A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., Marco Chávez, Carranza-Álvarez, C. y García-Carrancá, A. 2012. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltl (Acanthaceae). *J Ethnopharmacol.* 143: 455-462.

Pelletier, X., Belbraouet, S., Mirabel, F., Peerrin, J. L., Pages, X. y Debry, G. 1995. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutr Metab.* 39: 291-295.

Pelley, J. W. 2008. Elsevier's integrated biochemistry. 1ª Edición. Edit. Mosby Elsevier. China. Capítulos 6 y 7.

Peña-Agüero, B. 2010. Usos y aplicaciones del Muicle. 1:2-4

Peraza-Reyes, L. 2008. Catalasa. 13: 183-199 Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médicas. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno.

Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., De la Mora-de la Mora, J. I., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R. y Martínez-Gordillo, M. N. 2001. Mortality and morohological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proc West Pharmacol Soc.* 44: 151-152.

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

Prieto, J. M., Yuste, J. R. 2010. La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales. Exploración de los síndromes. Cuadro biológico de las enfermedades. 21ª edición. Elsevier España, S.L.

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

Quiroz, G. F. 1997. Anatomía humana. 35ª edición. Edit. Porrúa México. Tomo II.

Raha, S., Robinson, B.H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25: 502-508.

Rash, J. O. y Norgaard, R. 1983. Renal enlargement: Comparative autoradiographic studies of 3H-thymidine uptake in diabetic and uninephrectomized rats. *Diabetología*. 25(3): 280-287.

Reske-Nielsen, E., Lundbaek, K. y Rafaelsen, O. J. 1965. Pathological changes in the central and peripheral nervous system of young long term diabetics. *Diabetologia*. 1: 233-241.

Rizza, R. 2006. Effects of duration of type 2 diabetes mellitus on insulin secretion. *Endocr Pract* 12:388-393.

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

Roginsky, V. y Lissi, E. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem*. 92: 235-254.

Rolo, A. P. y Palmeira, C. M. 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 212: 167-178.

Serrano-Maldonado, M. J., Guerrero-Legarreta, I., de la Paz Pérez-Olvera, C., y Soriano-Santos, J. 2011. Antioxidant activity and citotoxic effect of *Cladoclea loniceroides (vanTieghem) Kujit (Loranthaceae)*. *Rev Mex Ing Quím*. 10: 161-170.

Sharp, P. E., Villano, J. 2013. The laboratory rat. 2da Edición. Florida, USA: CRC Press, pp. 6-7, 25.

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

Steward, R. y Liolitsa, D. 1999. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet. Med*. 16: 93-112.

Suhaj, M. 2006. Spice antioxidant isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Comp. Anal*. 19: 531-537.

Tapiero, H., Townsend, D. M. y Tew, K. D. 2003. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacolother*. 57: 321-325.

Taskinen, M., 2003. Diabetic dislipidemia: from basic research to clinical practice. *Diabetología*. 46:733-749.

Udayakumar, R. kashurirengan, S., Mariashibu, T.S., Rajesh, M., Anbazhagan, V.R., Kim, S.C. Ganapathi, A. y Choi, C.W. 2009. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Withania*

somnifera root and leaf extracts on alloxan-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci.* 10(5):2367-82.

Vasudevan, D. y Vaidyanathan, K. 2011. Bioquímica sexta edición. Mexico. Cuellar Ayala.

Vaya, J. y M. Aviram. 2001. Nutritional antioxidants; Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem.* 1: 99-117.

Venereo, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Milit.* 31(2): 126-133.

Wang, H. y Ng, T. 1999. Natural products with hipoglycemic, hipotensive, hipocolesterolémico, antiaterosclerótico y antitrombótico actividades. *Life Sciences* 65:2663-2677.

Wang, Y., Cao, J., Weng, J. H. y Zeng. S. 2005. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin accumulated human breast cancer cells, by high-liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 39: 328-333.

Watell, A., Kamel, S., Mentaverri, R., Lorget, F., Prouillet, C., Petit, P. J., Fardelonne, P. y Brazier, M. 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem Pharmacol.* 65: 35-42.

Wessels, A. M., Simsek, S., Remijnse, P. L., Veltman, D. J., Biessels, G. J., Barkhof, F., Scheltens, P., Snoek, F. R., Heine, R. J. y Rombouts, S.A. 2006. Voxel-based morphometry demonstrates reduced grey matter density on brain MRI in patients with diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 49(10): 2474-2480.

Yardim-Akaydin, S., Sepici, A. y Ozkan, Y. 2004. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allantoin a Marker of Oxidative Stress?. *Free Radical Research.* 38(6): 623-628.

Yeh, G., 2003. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care.* 26: 1277-1294.

Zepulveda-Jimenez, G., Reyna-Aquino, Celerino., Chaires-Martínez Leandro., Bermúdez-Torres, Kalina, y Rodríguez-Monroy, Mario. 2009. Antioxidant Activity and Content of Phenolic Compounds and Flavonoids from *Justicia spicigera*. *J biol sci.* 9(6): 629-632.

Zheng, W. y Shioow, Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem.* 49: 11.

Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G. P. Franco, R. y A. G. Georgakilas. 2012. Pleiotropic effects of natural products in ROS induced carcinogenesis: the role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. *Cancer Lett.* 327: 16-25.