



Posgrado en Biotecnología

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS

" CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MUÉRDAGO (*Cladocolea loniceroides*) SOBRE LA GLUCEMIA Y ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES CON DIABETES INDUCIDA "

Para obtener el grado de

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en Biotec. Frida Monserrat Hosanna Paredes Ruiz

Matrícula: 2133805859

Director(a):

Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor:

Dra. Edith Ponce Alquicira

Jurado:

Presidente: Dra. Edith Ponce Alquicira

Secretario: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: Dra. Lilia Sánchez Minutti

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Iztapalapa, Ciudad de México a 23 de octubre de 2023

Iztapalapa, Ciudad de México a 23 de octubre de 2023.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**" CORRELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
EXTRACTOS DE MUÉRDAGO (*Cladocolea loniceroides*) SOBRE LA
GLUCEMIA Y ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES CON DIABETES
INDUCIDA"**

que presentó

M. en Biotec. Frida Monserrat Hosanna Paredes Ruiz

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira

Handwritten signatures in blue ink on two horizontal lines. The top signature is for Dr. Jorge Soriano Santos and the bottom signature is for Dra. Edith Ponce Alquicira.

Jurado:

Presidente: Dra. Edith Ponce Alquicira

Secretario: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: Dra. Lilia Sánchez Minutti

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Handwritten signatures in blue ink on four horizontal lines. From top to bottom: Dra. Edith Ponce Alquicira, Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía, Dra. Lilia Sánchez Minutti, and Dr. Gerardo Díaz Godínez.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT, con la referencia 001466”

Este trabajo contó con el apoyo del CONAHCyT a través de la beca 265661

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que afecta a un porcentaje elevado de la población y cuya prevalencia va en aumento. Recientemente, se ha reportado que los polifenoles (PF) obtenidos a partir de diferentes fuentes vegetales tienen bioactividad frente a la hiperglucemia, ya que poseen actividad antidiabética. Se sabe que la inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos como la α -amilasa y la α -glucosidasa, es un elemento clave en la regulación de la DM. El muérdago *Cladocolea (C.) loniceroides*, una planta parásita, endémica de México, ha demostrado tener polifenoles de diversa naturaleza química, que le confieren una gran actividad antioxidante. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro*, la actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa de extractos acuosos (EA) obtenidos de diferentes partes del muérdago *C. loniceroides* por maceración y ebullición; así como determinar la actividad antihiperglucémica en ratones diabéticos, inducidos por estreptozotocina (STZ). Para cumplir con dicho objetivo se determinó en EA de tallo, hoja, fruto verde y fruto maduro de *C. loniceroides* la concentración de polifenoles totales (PFT), flavonoides, taninos condensados; la actividad antioxidante se cuantificó por los métodos de reducción de radicales DPPH y ABTS, FRAP y actividad quelante de Fe^{2+} . Posteriormente se determinó el valor IC_{50} de la actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa *in vitro* en EA de *C. loniceroides*. Los extractos que presentaron el IC_{50} más bajo fueron seleccionados para realizar una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones normoglucémicos (NG) que se alimentaron con almidón o sacarosa. Posteriormente, se evaluó el efecto de los extractos de muérdago en ratones diabéticos inducidos por STZ. En el día 35 del tratamiento, se evaluó el efecto del estrés oxidativo, como peroxidación lipídica, estado redox del glutatión, actividades específicas de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), citoquinas y análisis de aminotransferasas.

Los EA por ebullición de hojas y tallos de *C. loniceroides* resultaron con el mayor contenido de PFT (4.28 ± 0.09 y 4.34 ± 0.09 mg eq. AG (Ácido gálico) /mL, respectivamente) de todos los tratamientos; en el tallo se observó la mayor presencia de flavonoides (8.68 ± 0.14 mg eq. Rut (Rutina)). Mientras el EA por ebullición del fruto verde contenía la mayor cantidad de taninos

(13.1 mg eq. Cat (Catequina)/100 g). Los PFT obtenidos por ebullición de las diferentes partes del muérdago inhibieron con mayor facilidad la α -amilasa y α -glucosidasa de manera competitiva. Solo en el caso del fruto maduro, macerado por 30 min, la inhibición de α -glucosidasa fue no competitiva. Estos resultados muestran que la extracción de PF por ebullición, contenidos en el muérdago, inhiben aproximadamente del 40-80% más la actividad de las enzimas amilolíticas, en comparación con los extractos acuosos obtenidos por maceración. La mayor actividad antihiper glucémica se encontró en los EA de fruto verde y tallo, debido a que redujeron la respuesta glucémica en un 23% y 25%, respectivamente. El EA de fruto verde disminuyó el malondialdehído (MDA) 1,76 veces; mantuvo la relación GSH / GSSG (3.08 ± 0.66); la actividad de GPx se redujo (24%); la IL-6 disminuyó (18%) y la concentración de TNF-(37%) se niveló con respecto a los ratones diabéticos inducidos por STZ; los niveles de transaminasas hepáticas ALT (Alanina transaminasa) y AST (Aspartato transaminasa) fueron casi iguales en comparación con los encontrados en los ratones NG.

En conclusión, la extracción de *C. loniceroides* obtenida por ebullición durante 30 min es suficiente para obtener fracciones polifenólicas con actividad antioxidante *in vitro*; así como actividad inhibitoria de α -glucosidasa y α -amilasa. Aunque en los EA de hoja y tallo de *C. loniceroides* el contenido de PFT y actividad antioxidante *in vitro* fueron mayores que en los otros extractos, fue en el EA de fruto verde donde se mostró un efecto antihiper glucémico a través de la inhibición de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos. Además de tener esta actividad, un estudio adicional puede ser interesante para el tratamiento de la diabetes debido a que también mostro tener efectos sobre el estrés oxidativo y los antiinflamatorios.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a disease that affects a high percentage of the population and whose prevalence is increasing. Recently, it has been reported that polyphenols (PP) obtained from different plant sources have bioactivity against hyperglycemia, since they have antidiabetic activity. It is also known that the inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes such as α -amylase and α -glucosidase, it is a key element in the regulation of DM. The mistletoe *Cladocolea (C.) loniceroides*, a parasitic plant, endemic to Mexico, has been shown to have polyphenols of diverse chemical nature, which give it great antioxidant activity. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antioxidant activity *in vivo* and *in vitro*, the inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase from aqueous extracts (AE) obtained from different parts of *C. loniceroides* by maceration and boiling; as well as to determine the antihyperglycemic activity in diabetic mice induced by streptozotocin (STZ). To achieve this objective, the concentration of total polyphenols (TPP), flavonoids, condensed tannins was determined in AE of stem, leaf, green fruit and mature fruit of *C. loniceroides*; the antioxidant activity was quantified by DPPH and ABTS radical reduction methods, FRAP and Fe^{2+} chelating activity. Subsequently, the IC_{50} value of the inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase was determined *in vitro* in AE of *C. loniceroides*. The extracts that presented the lowest IC_{50} were selected to perform a glucose tolerance test in normoglycemic (NG) mice that were fed starch or sucrose. Subsequently, the effect of mistletoe extracts on diabetic mice induced by STZ was evaluated. On the 35th day of treatment, the effect of oxidative stress was evaluated such as, lipid peroxidation, redox status of glutathione, specific activities of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), cytokines and analysis of aminotransferases.

The AE by boiling leaves and stems of *C. loniceroides* resulted with the highest TPP content (4.28 ± 0.09 and 4.34 ± 0.09 mg eq. gallic acid /mL, respectively) of all treatments; in the stem, the highest presence of flavonoids was observed (8.68 ± 0.14 mg eq.rutin). While the AE by boiling the green fruit contained the highest amount of tannins (13.1 mg eq. catechin/100 g). The TPP obtained by boiling the different parts of the mistletoe more easily inhibited α -amylase and α -glucosidase in a competitive manner. Only in the case of mature fruit, macerated for 30

min, inhibition of α -glucosidase was uncompetitive. These results show that the extraction of PP by boiling, contained in the mistletoe, inhibits approximately 40-80% more the activity of the amylolytic enzymes, in comparison with the aqueous extracts obtained by maceration. The greatest antihyperglycemic activity was found in green fruit and stem AE, because they reduced the glycemic response by 23% and 25%, respectively. The AE of green fruit decreased malondialdehyde (MDA) 1.76 times; maintained the GSH / GSSG ratio (3.08 ± 0.66); the activity of GPx was reduced (24%); IL-6 decreased (18%) and the concentration of TNF- (37%) was leveled with respect to diabetic mice induced by STZ; the levels of liver transaminases ALT (Alanine transaminase) and AST (Aspartate transaminase) were almost equal in comparison with those found in the NG mice.

In conclusion, the extraction of *C. loniceroides* obtained by boiling for 30 min is sufficient to obtain polyphenolic fractions with antioxidant activity in vitro; as well as inhibitory activity of α -glucosidase and α -amylase. Although in leaf and stem AE of *C. loniceroides* the content of TPP and antioxidant activity in vitro were higher than in the other extracts, it was in green fruit AE that an antihyperglycemic effect was shown through the inhibition of enzymes carbohydrate hydrolyzates. In addition to having this activity, an additional study may be interesting for the treatment of diabetes because it also showed effects on oxidative stress and anti-inflammatories.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	1
1.2. Estrés Oxidativo.....	4
1.3. Antioxidantes.....	7
1.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	7
1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	9
1.3.3. Compuestos polifenólicos.....	10
1.3.4. Antioxidantes en el muérdago (<i>Cladoclea loniceroides</i>).....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVO.....	17
5.1. Objetivos específicos.....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1. Obtención del extracto.....	19
6.2. Cuantificación de polifenoles totales.....	19
6.3. Cuantificación de taninos condensados.....	20
6.4. Cuantificación de flavonoides.....	21
6.5. Evaluación de la actividad antioxidante.....	21
6.5.1. Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).....	21
6.5.2. Método de decoloración del radical catiónico ABTS.....	22
6.5.3. Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•).....	23
6.5.4. Poder reductor del ion Fe ²⁺	23
6.5.5. Evaluación de la actividad quelante de Fe ²⁺	24
6.6. Actividad antidiabética <i>in vitro</i>	25
6.6.1. Actividad de inhibición de α-amilasa.....	25

6.6.2. Actividad de inhibición de α -glucosidasa.....	25
6.6.3. Estudio de la cinética.....	26
6.7. Actividad antidiabética <i>in vivo</i>	26
6.7.1. Efecto antidiabético agudo de las muestras de ensayo	27
6.7.2. Efecto antidiabético subcrónico de las muestras de ensayo	27
6.8. Actividad de transaminasas	28
6.9. Determinación de citocinas proinflamatorias	28
6.10. Estrés oxidativo	29
6.10.1. Determinación de GSH.....	29
6.10.2. Determinación de GSSG	29
6.10.3. Actividades de la GPX y GR.....	30
6.10.4. Método para cuantificar sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Determinación de compuestos fenólicos totales.....	32
7.2. Cuantificación de taninos condensados	33
7.3. Cuantificación de flavonoides	34
7.4. Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).....	35
7.5. Inhibición del radical catiónico ABTS	36
7.6. Inhibición del radical DPPH.....	37
7.7. Poder reductor	37
7.8. Actividad quelante de Fe^{2+}	38
7.9. Inhibición enzimática <i>in vitro</i>	40
7.9.1. Actividad inhibitoria de α -amilasa	40
7.9.2. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa.....	43
7.10. Actividad antihiper glucemiante.....	47
7.11. Transaminasas hepáticas AST y ALT	50
7.12. Efecto de los extractos de <i>C. loniceroides</i> sobre la secreción de citocinas	51
7.13. Marcadores del estrés oxidativo	53
7.13.1. Efecto de <i>C. loniceroides</i> y acarbose sobre la concentración de GSH, GSSG, GPx y GRd.....	53
7.13.2. Peroxidación lipídica	55
8. CONCLUSIONES.....	57

9. RECOMENDACIONES	58
10. APÉNDICES	59
Apéndice A	59
Apéndice B	60
Apéndice C	61
Apéndice D	62
Apéndice E	63
Apéndice F	64
Apéndice G	65
Apéndice H	66
Apéndice I	67
11. BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía redox del glutatión. La enzima glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) inactivan al H ₂ O ₂ y lipoperóxidos, a través del GSH.....	9
Figura 2. Diagrama general de trabajo a partir del fruto de <i>C. loniceroides</i>	18
Figura 3. Reacción de los compuestos polifenólicos (ácido gálico usado como referencia) con el reactivo de Folin Ciocalteu para formar el cromóforo detectable a 765 nm.	20
Figura 4. Fundamento de la técnica de vainillina-HCl para cuantificación	20
Figura 5. Reacción de flavonoides (rutina como referencia) con tricloruro de aluminio para la formación del cromóforo detectable a 510nm.....	21
Figura 6. Reacción de formación de complejo colorido con hexacianoferrato de potasio para la evaluación del poder reductor.....	23
Figura 7. Reacción de quelación de ferrozina para formación del complejo colorido.	24
Figura 8. Reacciones para la determinación de GPx. La GPx cataliza la reducción del H ₂ O ₂ o L-OOH, utilizando como substrato el GSH para la transformación de GSSG y con el acoplamiento de la actividad de GR se lleva a cabo la oxidación de NADPH + H ⁺ , con cambios en la absorbancia.	30
Figura 9. Flavonoides	35
Figura 10. Poder reductor de diferentes extractos de muérdago <i>C. loniceroides</i> . (a) Fruto verde, (b) Fruto maduro, (c) Tallo y (d) Hoja.	38
Figura 11. Gráfica de correlación lineal (p<0.05) de concentración de polifenoles totales de <i>C. loniceroides</i> y % de Inhibición de α -amilasa. (a) Concentración de polifenoles totales del EA de fruto maduro. (b) Concentración de polifenoles totales del EA de fruto verde.....	41
Figura 12. Grafica de doble-reciproco de la velocidad inicial v de las reacciones de hidrolisis catalizadas por α -amilasa a diferentes concentraciones de almidón en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto de <i>C. loniceroides</i>	42
Figura 13. Gráfica de correlación lineal (p<0.05) de concentración de polifenoles totales de <i>C. loniceroides</i> y % de Inhibición de α -glucosidasa.....	44
Figura 14. Grafica de doble-reciproco de la velocidad inicial v de las reacciones de hidrolisis catalizadas por α -glucosidasa a diferentes concentraciones de sustrato, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto de <i>C. loniceroides</i>	45

Figura 15. Evaluación de la actividad de la α -amilasa durante la administración de <i>C. loniceroides</i> y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.....	47
Figura 16. Evaluación de la actividad de la α -glucosidasa durante la administración de <i>C. loniceroides</i> y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.....	48
Figura 17. Evaluación de la actividad de la α -glucosidasa durante la administración de <i>C. loniceroides</i> y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.....	50
Figura 18. Evaluación de la actividad de la α -glucosidasa durante la administración de <i>C. loniceroides</i> y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.....	52
Figura 19. Actividades de GPx y GR en hígado de ratones con diabetes experimental tratados con <i>C. loniceroides</i> y acarbosa. Las barras representan la media \pm D.E: $p < 0.05$ con respecto al control.....	55
Figura 20. Determinación de la concentración de MDA, después de una dosificación diaria durante cinco semanas de EA de <i>C. loniceroides</i> , evaluada en el hígado de ratones diabéticos inducidos con STZ.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de harina de muérdago.....	32
Tabla 2. Concentración de taninos de los extractos crudos de hojas, tallos y frutos de <i>C. loniceroides</i>	33
Tabla 3. Contenido de flavonoides para los extractos crudos de hojas, tallos y frutos de <i>C. loniceroides</i>	34
Tabla 4. Ensayo FRAP para los extractos crudos de hojas, tallos y frutos de <i>C. loniceroides</i>	36
Tabla 5. Valor de EC ₅₀ para inhibir el radical ABTS-persulfato de extractos de muérdago.....	37
Tabla 6. Valores de EC ₅₀ del radical DPPH• de cada extracto de muérdago.	37
Tabla 7. Valores de EC ₅₀ obtenidos de la actividad quelante de hierro de extractos.	39
Tabla 8. Evaluación de la actividad inhibitoria de α -amilasa de extractos de muérdago.....	40
Tabla 9. Parámetros cinéticos de la inhibición de α -amilasa con extractos de frutos de <i>C. loniceroides</i>	43
Tabla 10. Evaluación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de extractos de muérdago.	43
Tabla 11. Parámetros cinéticos de la inhibición de α -glucosidasa con extractos de frutos de <i>C. loniceroides</i>	46
Tabla 12. Niveles de GSH después de la administración diaria de <i>C. loniceroides</i> y acarbosa en ratones con diabetes inducida.	54

1. Introducción

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es parte de un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por una hiperglucemia crónica debido al déficit en la secreción y/o actividad de la insulina, hormona liberada por las células β del páncreas. La hiperglucemia sostenida se manifiesta a través de varios síntomas, como son: en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Dichos síntomas pueden aparecer de forma repentina (Alberti & Zimmet, 1998). Se establece hiperglucemia por una prueba sanguínea anormal: una concentración plasmática de glucosa ≥ 7 mmol/L (o 126 mg/dL) o bien $\geq 11,1$ mmol/L (o 200 mg/dL) 2 horas después de haber bebido una solución con 75 g de glucosa.

A largo plazo, los pacientes con DM desarrollan enfermedades incapacitantes que, si no son tratadas convenientemente, pueden llevar a la pérdida de un órgano, parte de un miembro, o poner en riesgo su vida. Estas enfermedades incapacitantes, conocidas en conjunto como complicaciones agudas y crónicas de la DM, son las principales causas de la invalidez y la mortalidad de los pacientes con diabetes, y son: coma cetoacidótico o diabético, coma hiperosmolar, coma hipoglucémico, nefropatía, neuropatía, retinopatía, enfermedad cardíaca, arterial cerebral, gangrena e infecciones recurrentes (Jiménez Navarrete, 2000).

Los cambios en la forma de vida y por tanto de la alimentación de las personas durante el siglo pasado han dado lugar a un aumento dramático en la incidencia de la DM en todo el mundo, mismo que se ha relacionado a factores genéticos (Zimmet *et al.*, 2001). México está considerado entre los 10 países con mayor incidencia y prevalencia de la DM. Esta enfermedad subcrónico-degenerativa en 2006 afectó a cerca del 10% de la población de nuestro país y actualmente constituye la segunda causa de mortalidad (King *et al.*, 1998). Como consecuencia, los costos en servicios médicos asociados al tratamiento epidemiológico de la DM y sus complicaciones actualmente representan una gran carga para los servicios de salud y para los pacientes (Carvajal *et al.*, 2007). Las principales causas de muerte por diabetes son las enfermedades cardíacas (en el 50% de los casos), cerebro-vascular (12%) y renal (10%). En

conjunto, las enfermedades vasculares producen la muerte de casi el 72% de los diabéticos. En el resto de los casos, el 10% fallece por cáncer, el 6% por infecciones respiratorias y renales, el 1% por coma diabético y el 11% por otras causas (Olaiz *et al.*, 2007).

La Organización mundial de la salud (OMS) calculó que la mortalidad por diabetes aumento el 5% (2023, Octubre 01). Se calcula que en 2012 fallecieron 1.5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes. Más del 80% de las muertes por diabetes se registra en países de ingresos bajos y medios. Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 (Mathers & Loncar, 2006). La dieta saludable, la actividad física regular, el mantenimiento de un peso corporal normal y la eliminación del consumo de tabaco pueden prevenir la diabetes de tipo 2 o retrasar su aparición.

Actualmente los criterios de clasificación se basan en la evidencia etiológica. La clasificación de DM incluye cuatro clases clínicas:

1. DM tipo 1 (DM1): también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia; se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo 1 y no se puede prevenir con el conocimiento actual.

2. DM tipo 2 (DM2): de inicio lento que se manifiesta principalmente en la edad adulta. En este tipo de diabetes cae aproximadamente el 90% de los casos diagnosticados. El páncreas de estos pacientes genera y libera insulina, pero ésta resulta insuficiente, ya sea, por déficit en su secreción y/o resistencia a la acción de esta hormona. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse solo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones. Hasta hace poco, este tipo de diabetes solo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños (Alberti & Zimmet, 1998).

3. DM gestacional (DMG): se caracteriza por hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre) que aparece durante el embarazo y alcanza valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes. Las mujeres con diabetes gestacional corren mayor riesgo de sufrir complicaciones durante el embarazo y el parto.

Además, tanto ellas como sus hijos corren mayor riesgo de padecer diabetes de tipo 2 en el futuro (OMS, 2013). Suele diagnosticarse mediante las pruebas prenatales, más que porque el paciente refiera síntomas.

4. Otros tipos de diabetes: entre los que se encuentran: defectos genéticos de las células β pancreáticas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas, diabetes inducida por medicamentos o debido a otros síndromes (Molina & Rodríguez, 2012).

Para dar tratamiento a la DM además de controlar la dieta y hacer ejercicio se administran antidiabéticos orales. Un antidiabético oral es un fármaco que se administra por vía oral, que actúa disminuyendo los niveles de glucemia. Existen tres grandes familias de antidiabéticos según su forma de actuar sobre la glucemia que son (González *et al.*, 2014):

1. Secretagogos, cuya acción estimula la secreción de insulina. a) sulfonilureas: Estimulan la secreción endógena de insulina por parte de los islotes pancreáticos b) meglitinidas: Actúan sobre las células beta en un sitio distinto a las sulfonilureas.
2. Sensibilizantes: Mejoran la resistencia a la insulina y aumentan su sensibilidad en el hígado, tejidos muscular y adiposo, ejemplos de ello está la metformina, y las tiazolidinedionas.
3. Inhibidores: a) Inhibidores de la Di-Peptidil-Peptidasa-IV (DPP-IV): inhiben la acción de esta enzima favoreciendo la acción de las hormonas llamadas incretinas sobre sus órganos diana. b) Inhibidores de las alfa-glucosidasas intestinales, como la acarbosa y miglitol.

Una de las terapias más importantes para disminuir la hiperglicemia postprandial es retardar la absorción de la glucosa, mediante la inhibición de las enzimas que hidrolizan carbohidratos como α -glucosidasa y α -amilasa. Las mismas que retrasan la digestión y provocan un aumento del tiempo de permanencia de los carbohidratos, causando una reducción en la tasa de absorción de la glucosa (Sevilla *et al.*, 2013).

La α -amilasa (EC 3.2.1.1) es la enzima clave que cataliza la hidrólisis del almidón a oligosacáridos como maltosa y maltotriosa; así la α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) los degradan a glucosa, para poder ser absorbida al torrente sanguíneo (Espinosa *et al.*, 2013).

1.2. Estrés Oxidativo

La DM es un trastorno metabólico de múltiples facetas en el cual el incremento del estrés oxidativo juega un papel clave en la patogénesis de esta enfermedad debilitante. El estrés oxidativo indica un cambio hacia un entorno pro-oxidante en el equilibrio entre la formación de las especies oxidantes y antioxidantes. Los compuestos químicos capaces de producir especies reactivas de oxígeno se conocen como pro-oxidantes y compuestos desintoxicantes que se ha denominado como antioxidantes. La mayoría de los radicales libres que dañan los sistemas biológicos son los radicales libres de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno o ROS, así como especies reactivas de nitrógeno (RNS), se producen durante metabolismo celular normal. Tanto ROS y RNS tienen doble función como especies nocivas y beneficiosas, ya que pueden ser perjudiciales o beneficiosos para los sistemas vivos. Los radicales libres también surgen de la radiación, sustancias químicas ambientales, el humo del cigarro, y varias fuentes ambientales perjudiciales (Golbidi & Laher, 2011).

Como consecuencia de los trastornos metabólicos en la diabetes, se desarrollan diversas complicaciones incluyendo macro y micro disfunciones vasculares, las cuales tienen un papel central en los efectos de la hiperglucemia crónica y dañan el tejido. Muchos estudios han demostrado que la DM (tipo 1 y 2) se asocia con aumento formación de radicales libres y la disminución de la capacidad antioxidante, que conduce a daño oxidativo de componentes de la célula. Existen múltiples fuentes de la producción de ROS en la diabetes incluyendo los de origen mitocondrial y no mitocondrial, los cuales aceleran los cuatro mecanismos moleculares importantes involucrados en el daño oxidativo de tejidos inducidos por hiperglucemia. Estas cuatro vías son: activación de la proteína C-quinasa (PKC), el aumento de la vía de hexosamina, aumentó avanzado de glicación y productos finales (AGE), y el aumento de la vía de poliol (Golbidi *et al.*, 2011).

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, los más relevantes son:

A) Indicador de daño oxidativo en el citosol: Cociente GSSG/GSH: El glutatión (γ -glutamil cisteinil glicina) es un tripéptido que desempeña diversas funciones metabólicas de gran importancia, sobre todo relacionadas con la protección antioxidante de las células (Ferrer *et al.*, 1990). El grupo activo es el sulfhidrilo del residuo de cisteína, por lo que el glutatión puede ejercer su papel protector cuando se presenta en su forma reducida (GSH). Dos moléculas de GSH pueden oxidarse cediendo un electrón cada una y combinándose entre sí dando lugar la forma disulfuro (GSSG). Por ello, un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión, aumentando el cociente GSSG/GSH (Sies, 1986). Sin embargo, existen problemas metodológicos importantes en la determinación correcta del GSSG. En condiciones fisiológicas, los niveles de GSH son de dos a tres órdenes de magnitud mayores que los de GSSG. Además, el GSH se autooxida con facilidad a GSSG, sobre todo a pH neutro (Asensi *et al.*, 1994).

B) Indicadores de daño oxidativo a lípidos: Malondialdehído: Uno de los indicadores de daño oxidativo a lípidos más empleados es el malondialdehído (MDA). El MDA es uno de los productos generados durante el proceso de oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, causando la alteración de las mismas, la pérdida de la fluidez, y por tanto, aumenta la rigidez. Por ello el MDA es un indicador ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica de las membranas celulares. Estudios previos han mostrado que los niveles de MDA en pacientes diabéticos con problemas vasculares son mayores que en pacientes diabéticos sin esta complicación (Dyer *et al.*, 1997).

C) Indicadores de daño en hígado: La actividad de aspartato aminotransferasa (AST o GOT): La **aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1)**, antes conocida como transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) y también llamada aspartato transaminasa (AST) enzima presente en tejidos de mamíferos, principalmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Se ha visto que las concentraciones en suero son elevadas cuando hay infarto agudo al miocardio, hepatopatía

aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células. La GOT cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L-glutámico o L-aspartico) a cetoácidos específicos (α -cetoglutarico u oxalacético). Si bien a pH fisiológico la reacción está energéticamente favorecida hacia la formación de L aspartato y α -cetoglutarico, la reacción *in vivo* procede hacia la derecha a fin de proveer una fuente de nitrógeno al ciclo de la urea. El glutamato así producido es desaminado por la glutamato deshidrogenasa con formación de amoníaco y regeneración de α - cetoglutarico.

La actividad de alanina aminotransferasa (ALT o GPT): La **alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.2)**, anteriormente conocida como transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), también llamada alanina transaminasa (ALT), es una enzima aminotransferasa con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Cuando hay una lesión de estos órganos la ALT es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis.

D) Citocinas inflamatorias: Las citocinas son polipéptidos o glucoproteínas extracelulares, hidrosolubles, variando entre 8 y 30 kDa. Se generan por medio de diversos tipos de células en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteinocinasas activadas por mitógeno. A diferencia de las hormonas clásicas, las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas, y actúan especialmente por mecanismos paracrino (en células vecinas) y autocrino (en las propias células productoras) (Oliveira *et al.*, 2011) .

Por otro lado, se sabe que la inflamación contribuye a la resistencia a la insulina; la cual está asociada con la DM, obesidad, hipertensión y enfermedades del corazón (Birkenfeld & Shulman 2014). Se ha sugerido que el estrés oxidativo inducido por hiperglucemia y los productos finales de glicación avanzada inducen citoquinas inflamatorias. También hay evidencia que sugiere que la producción de interleucinas (IL) se incrementa en respuesta al aumento del estrés oxidativo a través de la estimulación de vías alternativas en la diabetes (Elmarakby & Sullivan, 2012). Debido a que en condiciones de hiperglucemia, el incremento de absorción de glucosa por las células endoteliales causa la sobreproducción de ROS en la mitocondria; lo cual produce daño oxidativo y dentro de las células endoteliales se activan cascadas de señalización inflamatoria (Brownlee, 2001). Es entonces cuando se liberan las citocinas pro-inflamatorias, que son en

parte responsables de disfunciones y complicaciones en la DM y otras enfermedades. En DM se ha encontrado que hay una sobre producción de citocinas pro-inflamatorias; las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 y TNF (factor de necrosis tumoral) (Khanra *et al.*, 2015) y la disminución de citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10, IL-13, FTCSβ (factor transformador de crecimiento β), adiponectina, adipocinas, etc. (Hossain *et al.*, 2010).

1.3. Antioxidantes

Los antioxidantes estabilizan o desactivan los radicales libres antes que se adhieran a las células. Los seres humanos han evolucionado sistemas muy complejos de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que trabajan sinérgicamente, y en combinación unos con otros, protegen a las células y sistemas de órganos contra los daños inducidos por radicales libres (Zorrilla García, 2002). Los antioxidantes pueden ser sustancias producidas endógenamente o ser obtenidos a partir de fuentes exógenas por ejemplo, como parte de una dieta o de suplementos dietéticos (Zamora, 2007). Un antioxidante ideal debe ser fácilmente absorbido y ser capaz de extinguir los radicales libres, así como quelar metales redox (Avello & Suwalsky, 2006). Estas sustancias deben trabajar en soluciones acuosas y/o dominios y la expresión génica de una manera positiva. Antioxidantes endógenos juegan un papel crucial en el mantenimiento óptimo de las funciones celulares y, por tanto sistémicas de la salud y el bienestar (Coronado *et al.*, 2015). Sin embargo, bajo condiciones que promueven el estrés oxidativo, los antioxidantes endógenos pueden no ser suficientes y los antioxidantes de la dieta pueden ser requeridos para mantener óptimas las funciones celulares (Llacuna & Mach, 2012).

1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

La **Glutación peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.19)**, enzima clave en el ciclo redox del glutatión, el cual es una fuente importante de protección contra los bajos niveles de estrés oxidativo, mientras que la catalasa es más importante en la protección contra el estrés oxidativo severo (Mates, 2000). La GPx es una selenoproteína que se localiza en el citosol y la matriz mitocondrial, requiere la presencia de glutatión (GSH) como agente reductor para catalizar la reducción de H₂O₂ y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol protegiendo así a las células contra el daño oxidativo (Izquierdo *et al.*, 2009). El selenio está ubicado en el sitio activo

en forma de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica. Se conocen cuatro isoformas de GPx: la primera de ellas GPx celular se localiza en casi todas las células; la segunda isoforma, la GPx plasmática o extracelular es una glicoproteína purificada que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón; la tercer isoforma es la GPx fosfolípido hidroperóxido que tiene como función biológica proteger contra la peroxidación lipídica reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, siendo la única isoforma que contiene un solo residuo de selenocisteína (Casanueva Álvarez, 2016). Finalmente, el cuarto tipo es conocido como GPx gastrointestinal, enzima con mayor dependencia del GSH, es muy importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol ayudando a prevenir la intoxicación por consumo de hidroperóxidos lipídicos. Una cuestión clave en los estudios que utilizan la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes, es si una mayor actividad de las enzimas antioxidantes reduce el estrés oxidativo endógeno, pero se ha observado que en algunos casos puede aumentar el daño oxidativo (Muller *et al.*, 2007).

La **Glutación reductasa (GR) (EC 1.8.1.7.)**, es una enzima clave en el metabolismo del glutatión. Esta flavin enzima es esencial para la reducción de disulfuro de glutatión (GSSG) a la forma reducida (GSH), necesaria para la protección de las células contra estrés oxidativo como antioxidante. GSH también es asociado a la reacción de desintoxicación de los xenobióticos, es un cofactor en la isomerización reacciones, y una forma de almacenamiento y transporte de cisteína. GR mantiene el potencial redox en células que mantienen grupos sulfhidrilo en forma reducida de proteínas intracelulares (Wu *et al.*, 2004).

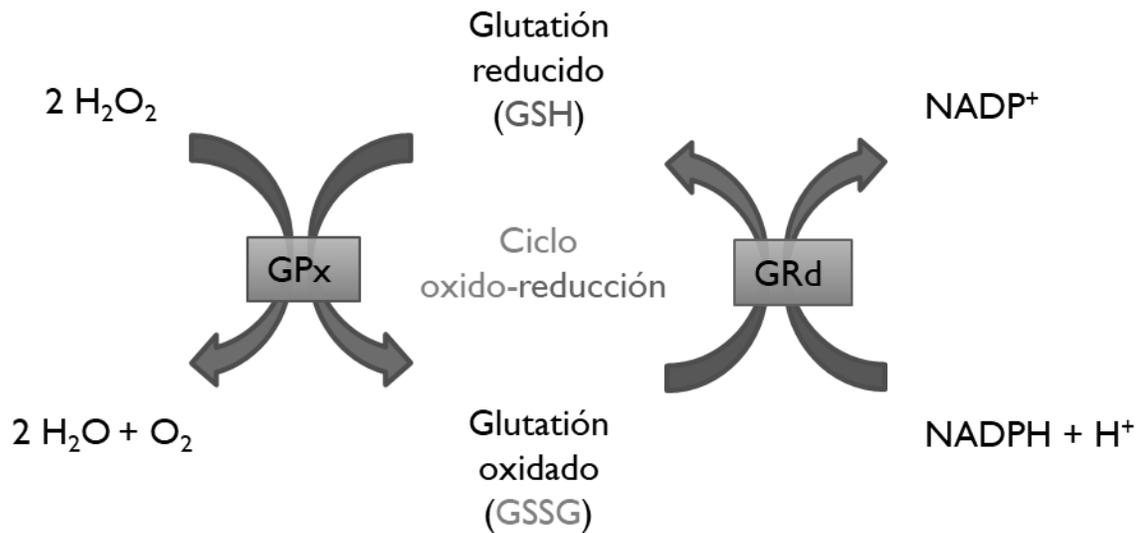


Figura 1. Vía redox del glutatión. La enzima glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GR) inactivan al H_2O_2 y lipoperóxidos, a través del GSH (Cisneros *et al.*, 1997).

1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

El glutatión es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos, está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina (Hopkins, 1921). Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula. El glutatión se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxidoreducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas (Van Bladeren, 2000). El GSH desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña *et al.*, 1995), una de ellas es la de proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, así como proteger frente al efecto nocivo de las radiaciones. Muchas de las funciones fisiológicas que desempeña el GSH se deben a 2 características de su estructura química:

1.-El grupo tiol (-SH) de la cisteína, que es el que interviene en las reacciones redox del glutatión.

2.-El enlace γ - glutamilo que le hace resistente a la degradación por peptidasas celulares. Este enlace sólo es hidrolizable por la enzima γ -glutamyl transpeptidasa situada en la membrana celular (Viña *et al.*, 1992).

1.3.3. Compuestos polifenólicos

Son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común. Según Harborne, (1998) los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura siendo los más importantes:

- Los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico son los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico que por regla general se hallan presentes en forma de derivados.
- Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de los polifenoles, siendo los más hallados en las plantas, con bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenil piranos. Esta estructura básica les permite presentar una multitud de sustituciones y variaciones dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanololes, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalcona, antocianidinas, leucoantocianidinas o, flavandioli, proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos ellos, las flavonas (p.e. apigenina, luteolina y diosmetina) y los flavonoles (p.e. quercetina, mirecitina, kampferol) son los compuestos más abundantes en los vegetales, donde se encuentran preferentemente en las capas más superficiales de verduras, frutas, cereales y otras semillas, para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores.

Los taninos vegetales (taninos hidrolizables y taninos condensados o proantocianidinas) son compuestos cuyo peso molecular puede encontrarse por encima de los 32000 Da (Vázquez *et al.*, 2012). Los taninos están muy extendidos en los alimentos de origen vegetal, en particular en semillas de leguminosas, cereales, frutas, verduras y diferentes bebidas tales como el vino, el té, el cacao, así como sidra. Son parte integral de la dieta humana y tiene efectos positivos para la salud y la nutrición (Isaza & Hipólito, 2007).

Actualmente existe un creciente interés en taninos como componente bioactivo de los alimentos, así como antioxidantes biológicos. Los taninos son un grupo único de metabolitos fenólicos solubles en agua de peso molecular relativamente alto y que tiene la capacidad de formar complejos fuertemente con los hidratos de carbono y proteínas (Chavan *et al.*, 1979).

En el pasado, los taninos se han considerado como antinutrientes de origen vegetal, ya que tienen la capacidad de precipitar proteínas, inhiben enzimas digestivas y disminuyen la absorción de vitaminas y minerales (Khattab *et al.*, 2010). Sin embargo, recientemente varios beneficios para la salud han sido atribuidos a la ingesta de taninos y algunas correlaciones epidemiológicas con la disminución de enfermedades crónicas han sido encontradas (Serrano *et al.*, 2009). Numerosos estudios han demostrado que los taninos tienen efectos biológicos importantes tales como actividad antioxidante, debida a la reducción de radicales, así como la inhibición de la peroxidación lipídica y la actividad de la lipoxigenasa *in vitro* (Amarowicz, 2007; Gyamfi & Aniya, 2002), tienen actividad antimicrobiana y antiviral (De Bruyne *et al.*, 1999; Dolara *et al.*, 2005), son antimutagénicos (Carlsen *et al.*, 2010), anticancerígenos (Cai *et al.*, 2017; Marzouk *et al.*, 2007) y tienen propiedades antidiabéticas (Abesundara *et al.*, 2004; Kuyanga *et al.*, 2011; Nain, 2012).

1.3.4. Antioxidantes en el muérdago (*Cladocolea loniceroides*)

El género *Cladocolea* comúnmente conocido como muérdago verdadero o injerto, es una planta parásita de árboles que a lo largo de los años ha pasado inadvertido a los arboricultores mexicanos. *C. loniceroides* fue el primer muérdago introducido accidentalmente, que ha sido documentado para México. Se sabe que los muérdagos se adhieren a los árboles mediante sustancias mucilaginosas y de esta manera proliferan, ya que obtiene agua y sales minerales del hospedero para poder desarrollarse (Sanés, 2005).

El muérdago es una planta que ocasiona graves daños a los árboles impidiendo su desarrollo hasta causarle la muerte. Parasita árboles y arbustos de diferentes familias sin que requieran de una determinada especie para hospedarse. El muérdago que infesta a la zona chinampera de Xochimilco identificado como *C. loniceroides*, se demostró que tanto en hojas, tallos y frutos contienen polifenoles de diversa naturaleza química, siendo en su mayoría taninos; lo cual le

confiere gran actividad antioxidante. Pruebas *in vivo*, utilizando ratas como modelo experimental, mostraron que la actividad antioxidante inhibe la lipoperoxidación (Serrano *et al.*, 2011).

Esta planta se ha estudiado extensamente respecto a su taxonomía, a las condiciones ambientales que favorecen su presencia, la histología de la germinación, la embriogénesis y el desarrollo del fruto (Alvarado & Saavedra, 2005). Sin embargo, poco se sabe de su uso para otros fines. Recientemente se ha evaluado su efecto citotóxico en células carcinogénicas de mama, así como su actividad antimicrobiana. En un estudio Serrano *et al.* (2010) evaluaron algunos extractos de la planta del muérdago mostrando que todos los extractos sin excepción presentaron poder reductor cuando se les comparó en un sistema de óxido-reducción en el que se tomó como referencia al glutatión reducido (GSH). En particular los extractos metanólicos y por saponificación presentaron un poder reductor superior al del GSH en el mismo sistema; mientras que los EA comparativamente tuvieron un menor poder reductor que el GSH.

2. Antecedentes

El creciente interés en los posibles efectos beneficiosos de suplementos antioxidantes en el tratamiento de la diabetes tiene un debate permanente sobre su valor en la prestación de terapias complementarias destinadas a mejorar la terapia estándar.

Los antioxidantes enzimáticos más eficientes implican glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. Antioxidantes no enzimáticos incluyen vitaminas E y C, antioxidantes tiol (glutatión, tiorredoxina y el ácido lipídico), la melatonina, los carotenoides, flavonoides naturales, y otros compuestos (Eikenaar *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado en líneas anteriores, la DM es un grupo de enfermedades que afecta a un porcentaje elevado de la población y cuya prevalencia va en aumento. Por ello, además de las medidas preventivas y el uso de fármacos dirigidos a reducir la hiperglucemia, la población también acude al uso empírico de plantas medicinales. En este sentido, la fitoterapia podría ser de utilidad en el control de la DM, sola o en combinación con la terapéutica convencional. Algunas plantas usadas por la población se aplican como remedio antidiabético, a la vez que son comestibles. Lo anterior es muy interesante debido a que se unen dos componentes esenciales en el control de la DM: alimentación y medicación. Así, las plantas antidiabéticas comestibles se pueden incluir en un menú para el tratamiento de pacientes con DM (Román *et al.*, 1992). Las investigaciones etnobotánicas realizadas en México informan el uso empírico de más de 300 plantas antidiabéticas (Hernández & Hernández, 1959). Cabe señalar que la mayoría de las especies antidiabéticas mexicanas son especies endémicas. De acuerdo con Aguilar & Xolalpa, (2002), y Hernandez (2002), entre las familias botánicas que contribuyen con más especies antidiabéticas mexicanas se encuentran: Asteraceae, Leguminosae, Cactaceae y Cucurbitaceae. Es un hecho que pocas plantas comestibles son usadas como remedios antidiabéticos. Sin embargo, algunas de ellas incluso pueden reducir los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre, como por ejemplo *Opuntia streptacantha* Lemaire (Cactaceae) y *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) (Hernandez *et al.*, 2002). Las plantas contienen (taninos, flavonoides antioxidantes naturales, vitaminas C y E, etc.) que se pueden preservar la función de las células y prevenir diabetes inducida por la formación de ROS (Rivera *et al.*, 1999). En la medicina popular de Turquía, algunas plantas comestibles tradicionales y se han

utilizado para disminuir los síntomas de la diabetes. Entre estos, *Cydonia oblonga* Mill. (*Rosaceae*), cuyo nombre común es el membrillo. La cocción de *Cydonia oblonga* se utiliza tradicionalmente en el tratamiento de la tos, el resfriado, la bronquitis, dolor abdominal, diarrea, nerviosismo, insomnio, disuria, y contra la hiperglucemia. *Allium porrum* L. (*Liliaceae*), cuyo nombre común es poro, ha sido utilizado en el tratamiento de hiperlipidemia, infertilidad en las mujeres, y externamente para el tratamiento de las hemorroides en diferentes regiones de Anatolia. Los bulbos frescos de la planta se hierven y se bebe (1-2 vasos) antes de los alimentos contra la diabetes en el área rural de Turquía. Se ha encontrado que estas plantas tienen efectos antidiabéticos y antihiperlipidemicos. Por lo que se ha especulado que la hipoglucemia observada y actividad antioxidante de hojas *Cydonia oblonga* y *Bulbos de Allium porrum* podrían estar relacionados con las cumarinas (escopoletina), taninos, terpenoides y flavonoides contenidos (Aslan *et al.*, 2010). *Helianthus tuberosus* L. (*Asteraceae*), nombre común de la alcachofa de Jerusalén, se cultiva como verdura en todo el mundo y es considerado como un diurético, lactagogue, afrodisíaco, y collagogue. El muérdago africano (*Viscum album*), una planta semi-parasita usada por la medicina tradicional en Nigeria, es usada como tratamiento de muchas enfermedades metabólicas como la hipertensión y diabetes mellitus. El consumo de té de muérdago ha sido usado para la prevención y control de padecimientos en diferentes partes de Nigeria y también se cree que mejora el sistema circulatorio y función del corazón (Nna *et al.*, 2013).

3. Justificación

La diabetes es un trastorno metabólico subcrónico que se presenta como un problema de salud importante en todo el mundo. Actualmente la diabetes se encuentra entre las primeras causas de muerte en México 6.4 millones de personas han sido diagnosticadas con diabetes. Se estima que cerca de 11.7 millones mexicanos tendrán diabetes para el año 2025. Este padecimiento se caracteriza por la deficiencia absoluta o relativa en la secreción de insulina y/o la acción de la insulina; se asocia con hiperglucemia crónica, así como alteraciones de hidratos de carbono, lípidos y metabolismo de las proteínas.

Muchos estudios sugieren que el estrés oxidativo juega un papel central en la patogénesis de este trastorno metabólico de múltiples facetas. El estado de inflamación subcrónico, también juega un papel en la patogénesis de esta enfermedad y que la lleva a complicaciones vasculares mediante el aumento de la producción de radicales libres y citoquinas proinflamatorias. La búsqueda de la cura para la diabetes continúa a lo largo de la medicina tradicional y alternativa, porque muchos suplementos a base de hierbas que se han utilizado para el control de la enfermedad o bien no son de fácil acceso, o hay falta evidencia científica para apoyar su eficacia, el uso de medicamentos a base de plantas para el tratamiento de la diabetes mellitus ha ganado importancia en todo el mundo y hay un aumento de la demanda para utilizar productos naturales con actividad antidiabética debido a los efectos secundarios asociados con la el uso de insulina y antidiabéticos orales.

Por ello se ha propuesto el uso de antioxidantes como complemento terapéutico. Recientemente, los taninos presentes en diversos alimentos vegetales han recibido atención considerable como promotores de la salud y varios estudios han informado sobre sus propiedades nutraceuticas. La alta actividad antioxidante de la planta parásita del muérdago *C. loniceroides*; endémica de Xochimilco; podría ser una fuente de antioxidantes, sobre todo taninos, que pueden coadyuvar al tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Y de esta manera se puede dar una utilidad a los desechos de la poda del muérdago para la elaboración de un producto de valor agregado.

4. Hipótesis

Los extractos acuosos obtenidos de *C. loniceroides* tendrán un efecto hipoglucemiante y una disminución en el estrés oxidativo en ratones con diabetes inducida.

5. Objetivo

- I. Evaluar el efecto antioxidante de extractos de *C. loniceroides* en el estrés oxidativo, la regulación de la glucemia y el estado inflamatorio de ratones con diabetes inducida.

5.1. Objetivos específicos

- I. Evaluar el efecto del método de extracción de diferentes partes de la planta de muérdago *C. loniceroides* sobre la actividad antioxidante *in vitro*.
- II. Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos acuosos de *C. loniceroides* sobre las enzimas hidrolizantes de carbohidratos; α -amilasa y α -glucosidasa.
- III. Evaluar el efecto de los extractos acuosos del muérdago *C. loniceroides* en la actividad antidiabética *in vitro*.
- IV. Evaluar el efecto, agudo y subcrónico, de los extractos acuosos de *C. loniceroides* sobre el estrés oxidativo y glucemia en ratones con diabetes inducida.

6. Materiales y Métodos

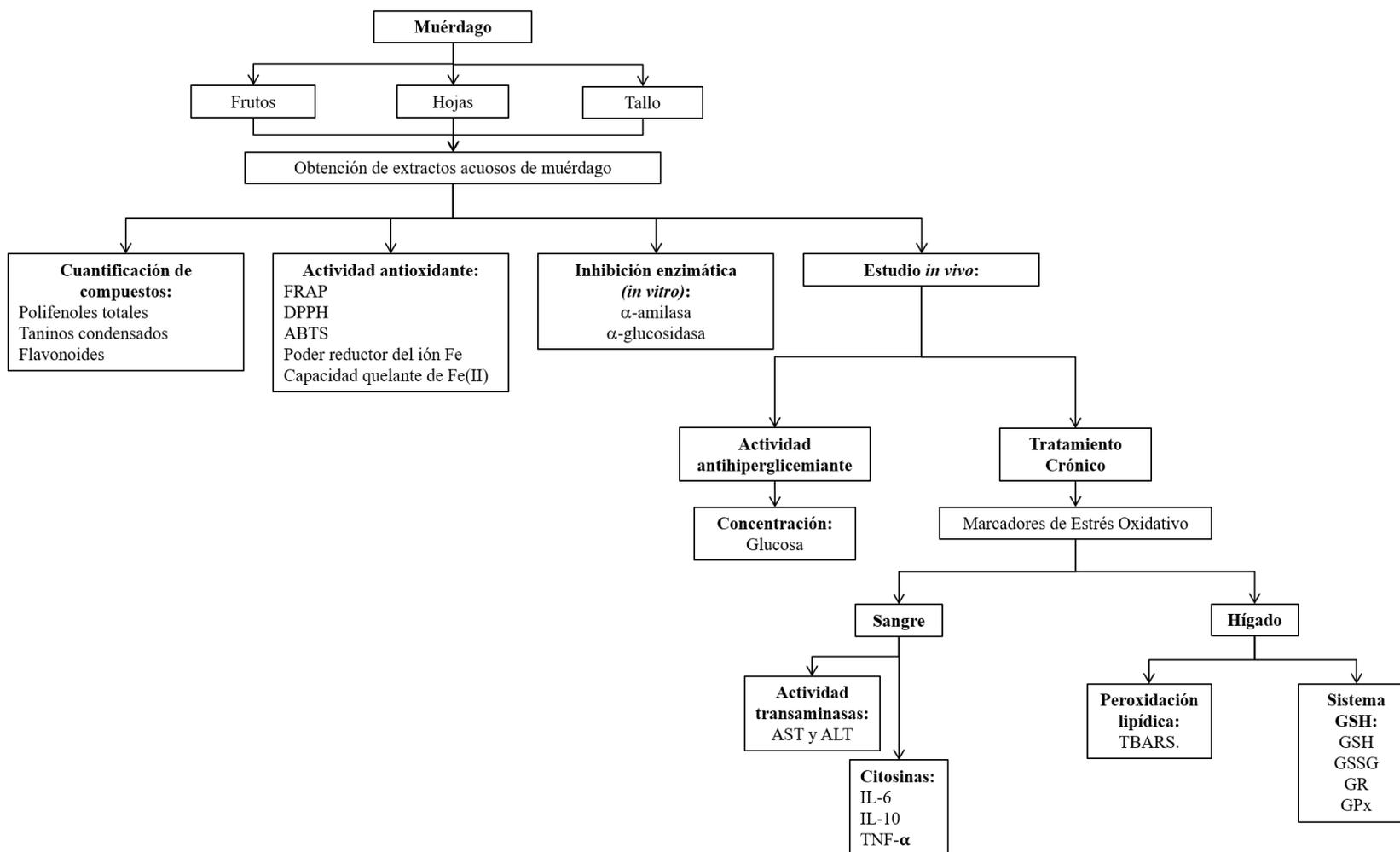


Figura 2. Diagrama general de trabajo a partir del fruto de *C. loniceroides*.

6.1. Obtención del extracto

Todas las partes de la planta de muérdago se desinfectaron con una disolución de NaClO 0.5%. Posteriormente las hojas y tallo del muérdago se secaron a temperatura ambiente, después se molieron y tamizaron hasta un tamaño de partícula de 0.250 mm (malla No.60) para obtener harina fina. En el caso de los frutos, estos se homogenizaron, hasta formar una pasta uniforme, pero solo antes del momento de ser usada, por lo que deben ser guardados en congelación - 20°C.

La **extracción por maceración**: La obtención de los extractos se realizó con 1 g de harina o pasta y se les adicionó 10 mL de agua, los cuales permanecieron en agitación a temperatura ambiente por 12, 24 y 48 h, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, todos los sobrenadantes se llevaron a un volumen conocido, los cuales se guardaron en congelación hasta su posterior uso.

La **extracción por decocción**: La extracción de los polifenoles del muérdago se hizo con 1 g de harina o pasta en el caso de los frutos y con 10 mL de agua, los cuales permanecieron en calentamiento hasta ebullición durante 30, 60 y 90 min, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min, todos los sobrenadantes se llevaron a un volumen conocido, los cuales se guardaron en congelación hasta su posterior uso.

6.2. Cuantificación de polifenoles totales

Los compuestos fenólicos fueron cuantificados, por el método de Folin-Ciocalteu. El método determinó el contenido total de polifenoles. Los compuestos fenólicos reaccionaron con el reactivo bajo condiciones alcalinas, por lo que la disociación de protones fenólicos dio lugar a un anión fenolato que fue capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (Figura 3). Se formó un complejo azul entre el fenolato y el reactivo independientemente de la estructura del compuesto fenólico (Singleton *et al.*, 1999).

La mezcla de reacción consistió en 500 µL de muestra con 4.5 mL de agua, se agregaron 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 500 µL de solución saturada de Na₂SO₄, se agitaron los tubos y se adicionaron por último 4.3 mL de agua destilada: Se leyó la absorbencia a 725 nm después de 1 h de reposo en la obscuridad. El contenido total de polifenoles se calculó en

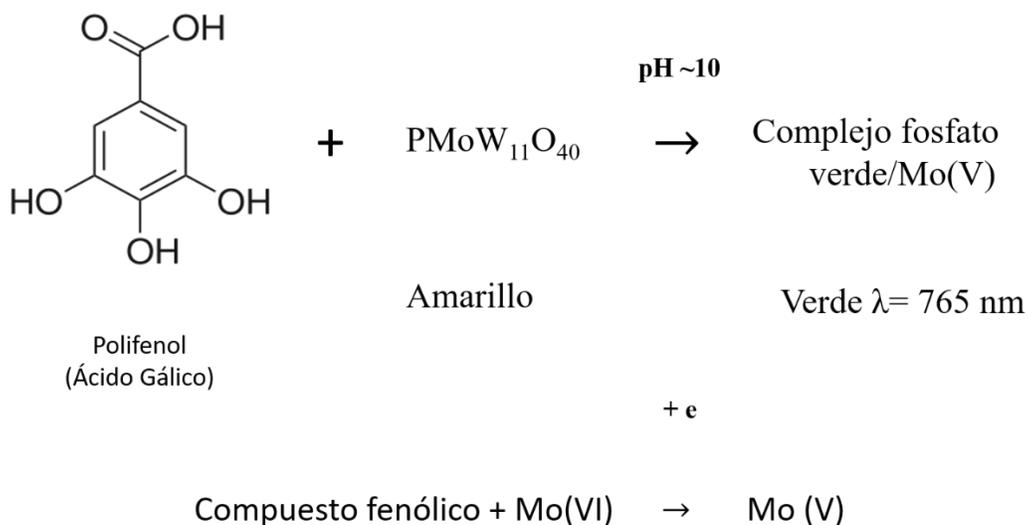


Figura 3. Reacción de los compuestos polifenólicos (ácido gálico usado como referencia) con el reactivo de Folin Ciocalteu para formar el cromóforo detectable a 765 nm. (Huang *et al.*, 2005)

equivalentes de ácido gálico (Apéndice A). Para determinar el rendimiento de las extracciones, se cuantificaron los polifenoles de cada muestra por el método de Folin-Ciocalteu. Se evaluó la concentración de polifenoles totales en todas las muestras obtenidas por los distintos métodos de extracción.

6.3. Cuantificación de taninos condensados

Se cuantificaron taninos condensados por el método de vainillina-HCl (Price *et al.*, 1978). La especificidad de este método se basa en que los flavonoles y dihidrochalconas tienen un enlace simple en las posiciones 2, 3, donde se une la vainillina creando el cromóforo (Figura 4).

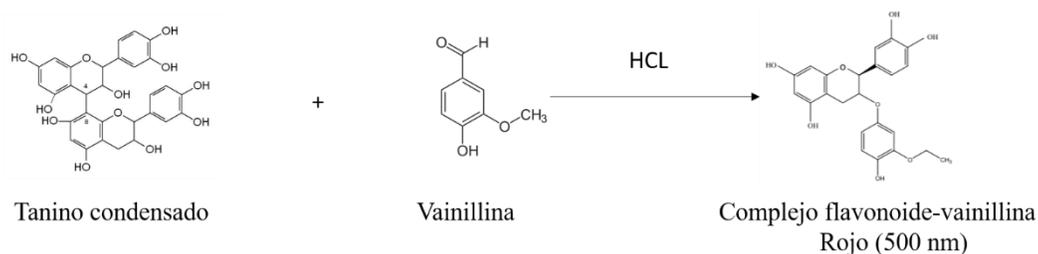


Figura 4. Fundamento de la técnica de vainillina-HCl para cuantificación. (Price *et al.*, 1978).

Se analizó la concentración de taninos condensados en los EA obtenidos por ebullición y maceración. La mezcla de reacción consistió en 125 μL de muestra, a los que se añadieron 750 μL de reactivo de vainillina (4% w/v en metanol) y 325 μL de HCl concentrado. Como referencia, se utilizó una solución de catequina (cat) con concentraciones de 100 a 1000 ppm (Apéndice B). La absorbencia fue detectada a una longitud de onda de 500 nm.

6.4. Cuantificación de flavonoides

Los grupos hidroxilo de las posiciones 3 y 5 en los flavonoides son revelados por desplazamiento batocrómico causado por la reacción con cloruro de aluminio (Figura 5). Los flavonoides se determinaron usando rutina como compuesto de referencia. Se tomaron 100 μL del extracto de fruto en cada uno de los EA, se adicionaron 1250 μL de agua destilada y 75 μL de NaNO_2 al 5%. Después de 6 min, se adicionaron 150 μL de AlCl_3 al 10% dejando reposar 5 min. En seguida, se adicionaron 500 μL de NaOH 1 M y 425 μL de agua destilada. La absorbencia fue leída inmediatamente a 510 nm. La curva patrón de rutina (Apéndice C) fue de 0 a 0.5 mg/mL (Hossain *et al.*, 2011).

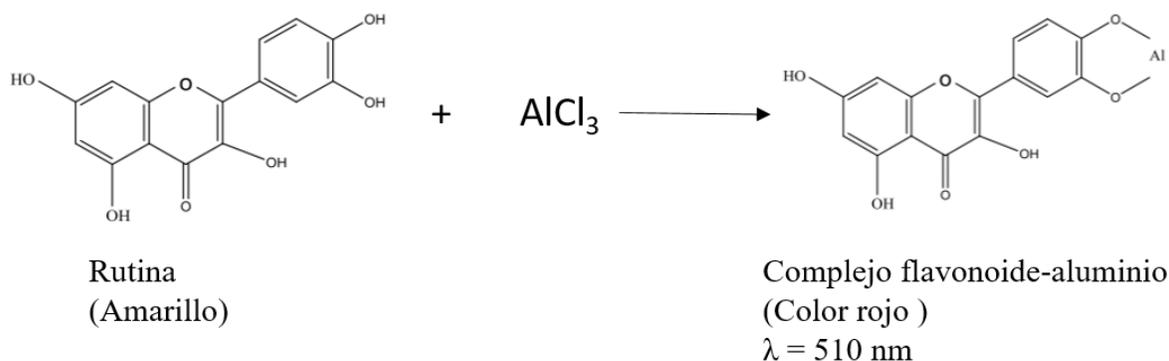


Figura 5. Reacción de flavonoides (rutina como referencia) con tricloruro de aluminio para la formación del cromóforo detectable a 510nm (O' Coinceanainn *et al.*, 2003).

6.5. Evaluación de la actividad antioxidante

6.5.1. Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)

El procedimiento se siguió de acuerdo al método descrito por (Benzie & Strain, 1996) método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). El complejo amarillo de Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-

tripiridil-s-triazina) fue reducido al complejo azul de Fe^{2+} -TPTZ por el electrón que dona una sustancia, en medio ácido. Cualquier electrón donado por una sustancia, con una alta reactividad y un bajo potencial redox, puede llevar a la formación del complejo azul $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ TPTZ.

La solución FRAP fue mezclada con 25.0 mL de Buffer Acetato pH 3.6, 2.50 mL de solución de TPTZ (10 mmol/L) y 2.50 ml de cloruro férrico (20 mmol/L). Una relación de 10:1:1. La disolución se preparó justo antes del experimento, se guardó en frasco ámbar y se incubó a 37°C. Se mezcló 30µL de cada muestra, con 900 µL de FRAP y 90 µL H_2O y se incubó a 37°C, después de 10 min se midió la absorbancia a 593 nm. La absorbancia final de las muestras, fueron comparadas con una curva estándar de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100-2000 µmol/L). Las curvas estándar fueron repetidas diariamente, durante tres días, al igual que las muestras. Cuyas lecturas servirán para el cálculo de valores de FRAP.

6.5.2. Método de decoloración del radical catiónico ABTS

El cual se basa en la capacidad de reducción del radical catiónico ABTS por las muestras que se evaluó por una versión mejorada de Re-Pellegrin (1988). El ABTS^+ que se generó por su oxidación a causa de la exposición con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) obteniéndose el radical catiónico ABTS^\pm o el dicatión ABTS^{2+} , se caracterizan por ser un color verde-azul intenso. Este radical presentó una estabilidad química elevada, su máxima absorción UV-Visible fue a 728 nm (Miller *et al.*, 1993).

Se mezcló una solución 7 mM de ABTS con una solución 2.45 mM de persulfato de potasio en agua, se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 h hasta obtener una solución azul oscuro intenso. Se diluyó en agua teniendo un volumen total de 3 mL, hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 leído a 734 nm. Esta solución se mezcló con 70 µL de la muestra. La absorbancia se monitoreó por cada minuto, por un tiempo total de 6 min a 30°C, se realizó una curva estándar de Trolox (Apéndice E). La capacidad de reducción de radicales se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_{C(0)} - A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \times 100$$

$A_{C(0)}$ = Absorbancia del control negativo en el momento de preparación de la solución.

$A_{A(t)}$ = Absorbancia de la muestra después de 7 min.

6.5.3. Capacidad de reducción del radical 2,2-difenol-1-picrilhidrazil (DPPH•)

El DPPH• en su forma radical presentó compuesto colorido púrpura alcanzando una absorción máxima a 517 nm en espectrofotómetro de UV-Vis. En su forma reducida posterior a la presencia de antioxidantes con los radicales, el DPPH• se tornó color amarillo. La reacción de reducción del radical DPPH• se observa en la figura 8. La decoloración de este compuesto en presencia de los compuestos antioxidantes, se monitorea para determinar la concentración de antioxidantes en la muestra de estudio (Brand *et al.*, 1995).

Para la capacidad de reducción del DPPH• de las muestras se mezclaron 300 µL de solución de DPPH• en metanol (0.5 mM) con 500 µL de la muestra. Se adicionaron 3.0 mL de metanol. La cinética de decoloración se monitoreó a 517 nm por un tiempo exacto de 45 minutos. Se realizó una curva estándar de ácido gálico (Apéndice F) El porcentaje de inhibición del radical se calculó con la siguiente ecuación.

$$\%Inhibición = \left[\frac{AC - AM}{AC} \right] \times 100$$

AC = Absorbencia del control negativo en el momento de preparación de la solución.

AM = Absorbencia de la muestra después de 45 min.

6.5.4. Poder reductor del ion Fe²⁺

El hexacianoferrato de potasio, con Fe⁺³ se reduce en presencia de antioxidantes a Fe⁺² formando un complejo KFe³⁺[Fe²⁺(CN)₆] de color azul que absorbe a una longitud de onda de 700 nm (Figura 6) (Yen & Chen, 1995).

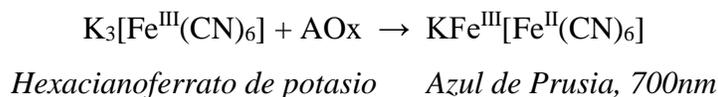


Figura 6. Reacción de formación de complejo colorido con hexacianoferrato de potasio para la evaluación del poder reductor.

Se mezcló la muestra 50 µL con 500 µL de hexacianoferrato de potasio, incubándose a 50°C durante 20 min. Posteriormente se añadieron 500 µL de ácido tricloroacético y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con 500 µL de agua destilada y 500 µL de

cloruro férrico. La absorbencia es medida a 700 nm después de 10 min de reposo, se realizó una curva estándar de ácido ascórbico (Apéndice G).

6.5.5. Evaluación de la actividad quelante de Fe²⁺

El Fe²⁺ forma un complejo con 3 moléculas de ferrozina de color púrpura que presenta absorbencia máxima a 562 nm. En presencia del antioxidante el Fe²⁺ puede quelarse y la intensidad de color púrpura del complejo con ferrozina es menor y es proporcional a la concentración del antioxidante en la muestra de interés (Figura 7) (Xie *et al.*, 2008).



Figura 7. Reacción de quelación de ferrozina para formación del complejo colorido.

Se mezcló 1 mL de solución muestra con 50 µL de FeCl₂ y 1.85 mL de agua destilada. Después se agregaron 100 µL de solución de ferrozina y se leyó la absorbencia a 562 nm después de 10 min de reposo a temperatura ambiente. Se realizó una curva estándar de EDTA (Apéndice H). Como control se usó agua destilada. Para determinar el porcentaje de quelación se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Efecto quelante} = \left[\frac{(AC - AA_{(t)})}{AC_{(o)}} \right] \times 100$$

Dónde:

AC: La absorbancia del control.

AA_(t) muestra: La absorbancia de la muestra después de 10 min.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.6. Actividad antidiabética *in vitro*

6.6.1. Actividad de inhibición de α -amilasa.

La actividad de inhibición de α -amilasa se midió siguiendo el método de Worthington (1993). Se tomó un volumen de 500 μ L de solución de almidón al 1% en 0.02 M de buffer fosfato de sodio pH 6.9, se añadieron 250 μ L de los extractos de cada muestra en 250 μ L de buffer de fosfato de sodio 0.02M pH 6.9 que contiene la solución de α -amilasa (3 U/mL) y se incubó a 37°C por 3 min. Después de la incubación, la reacción se detuvo con 1mL de reactivo de ácido dinitrosalicílico. Los tubos de ensayo se incubaron a continuación en un baño de agua hirviendo durante 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó a 10 veces con agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm. Las lecturas se compararon con el control, que contenía buffer en lugar de extracto de la muestra. Basado en el valor de absorbancia, el porcentaje de actividad inhibitoria fue calculada por:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Dónde:

Abs control: La absorbancia del control.

Abs muestra: La absorbancia de la muestra.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.6.2. Actividad de inhibición de α -glucosidasa

La actividad inhibitoria se determinó de acuerdo con el método descrito por Worthington (1993). A un volumen de 100 μ L de extracto de cada muestra, se le adicionaron 100 μ L de buffer de fosfato 0,1 M (pH 6,9) conteniendo la α -glucosidasa (1 U/mL) se agregaron en tubos y se incubaron a 25 °C durante 5 min. Después de la pre-incubación, se adicionó 100 μ L de la solución 5mM de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) en 0.1 M buffer de fosfato (pH 6.9) a cada tubo y la mezcla se incubó a 25 °C durante 25 min. Después del período de incubación se adicionó agua destilada en proporción 1:10, y se determinó la absorbancia a 405 nm y se comparó con el control que contenía 100 μ L de solución buffer en lugar de los extractos. Todos

los experimentos fueron realizados por triplicado. Basado en el valor de absorbancia, el porcentaje de actividad inhibitoria fue calculado por:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(\text{Abs control} - \text{Abs muestra})}{\text{Abs control}} \right] \times 100$$

Dónde:

Abs control: La absorbancia del control.

Abs muestra: La absorbancia de la muestra.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.6.3. Estudio de la cinética

La cinética de inhibición se estudió por el método gráfico de Lineweaver y Burk (doble-recíproco). Para el ensayo con α -amilasa se usó almidón de maíz al 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1%; las velocidades de reacción (V) se midieron cada 6 min durante 30 min (Rubilar et al., 2011). Para la α -glucosidasa se usó pNPG a una concentración de 0.1, 0.5, 1, 3 y 5 mM (Jaiswal, Srivastava, Bhatia, Mishra, & Sonkar, 2012). Las velocidades de reacción (V) se midieron cada 6 min durante 25 min. Los resultados se analizaron de acuerdo con la representación de Lineweaver y Burk método que permite la determinación de la constante de Michaelis (Km) y velocidad máxima (V_{máx}). La constante de inhibición (Ki) se calcula como sigue, donde [I] y [S] son la concentración de inhibidor y el sustrato, respectivamente.

6.7. Actividad antidiabética *in vivo*

Se utilizaron ratones CD1 machos (30-35 g) de 12 semanas del Centro de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana (Ciudad de México, México). Todos los procedimientos experimentales relacionados con los animales y el mantenimiento se realizaron de conformidad con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Entrega de Animales (NOM-062-ZOO-1999) y en conformidad con las normas internacionales sobre cuidado y uso de animales de laboratorio. Estos ratones se mantuvieron bajo ciclo automático de luz y oscuridad (12X12 h), así como temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad controlada (humedad relativa $55^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$). Los animales fueron alimentados con una dieta básica a los roedores

(Harland Laboratories, Indianapolis, EE.UU.) y agua *ad libitum*. La concentración de glucosa en sangre para los estudios agudo y subcrónico se determinó usando un sistema Accu-Chek® (Roche), basado en el método de glucosa oxidasa. Se recogieron muestras de sangre de la punta de la cola en los patrones de tiempo definidos.

6.7.1. Efecto antidiabético agudo de las muestras de ensayo

Para el efecto antidiabético agudo de las muestras de ensayo, los ratones CD-1 machos se dividieron en seis grupos de cinco ratones cada uno. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 h antes del experimento, permitiendo el acceso solamente al agua. Los niveles de glucosa en sangre se midieron después de administrar 300 mg/kg de los extractos de hojas, tallos, frutos rojos y verdes, vía intragástrica. Se utilizó acarbosa (100 mg/Kg) como referencia y se administró Carboximetil celulosa (CMC) al 0.5% al grupo de control. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron a los 30 min, luego se realizó la prueba oral de tolerancia a carbohidratos. Los ratones se administraron oralmente con 2 g/kg de almidón soluble, para realizar el test de tolerancia al almidón (STT) y sacarosa a 4 g/kg para el test de tolerancia a la sacarosa (OSTT), en ambos se evaluó el nivel de glucosa en sangre a las 0.5, 1, 1.5 y 2 h para obtener una curva de glucosa.

6.7.2. Efecto antidiabético subcrónico de las muestras de ensayo

Los ratones se dividieron en cinco grupos de cinco animales cada uno. Los grupos 2 - 4 recibieron una única administración intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (140 mg/Kg) disuelta en un tampón de citratos (0.1 M, pH 4.5), el grupo 1 recibió el tampón solamente. Se consideró que los ratones eran diabéticos cuando el nivel de glucosa en sangre en ayunas era \geq 200 mg /dL. Después de inducir la diabetes con STZ. Los grupos 1 y 2 recibieron solución salina isotónica (4 mg/Kg/día), mientras que el grupo 3 recibió acarbosa (100 mg/Kg/día), los grupos 4 y 5 recibieron fruto verde y extracto de tallo (300 mg/Kg/día), respectivamente. Estos tratamientos se administraron por sonda durante 35 días.

6.8. Actividad de transaminasas

Al concluir el tratamiento subcrónico de 35 días, se realizó la determinación de la actividad de las transaminasas, mediante tiras reactivas. Donde se llevan a cabo reacciones acopladas. En el caso de la alanina aminotransferasa (**ALT o GPT**). La medición de la enzima GPT se llevó a cabo en dos reacciones, primero, ésta cataliza la reacción de α -cetoglutarato y alanina en glutamato y piruvato. En la segunda reacción el piruvato formado se hidroliza bajo la acción de la piruvato-oxidasa a acetilfosfato, anhídrico carbónico y peróxido de hidrógeno. En presencia de la peroxidasa, el peróxido oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul y a través de una medición en un sistema Reflotrón Plus a 567 nm, siguiendo el desarrollo del colorante, se refleja la actividad enzimática de la transaminasa.

La determinación de la actividad de aspartato aminotransferasa (**AST o GOT**) fue descrito por Bergmeyer et al. (1986) y se basa en las siguientes reacciones acopladas. La primera, en presencia de GOT se transforma el α -cetoglutarato y sulfato de alanina en piruvato y glutamato. En la segunda reacción el piruvato formado se hidroliza bajo la acción de la piruvato-oxidasa, tal como en la determinación de GPT. El indicador formado azul se cuantifica en un sistema Reflotrón Plus a 567 nm.

6.9. Determinación de citocinas proinflamatorias

Por otro lado, después del tratamiento subcrónico los animales fueron anestesiados utilizando pentobarbital 25 mg/Kg para posterior sacrificio, se recolectó aproximadamente 1 mL de sangre del seno venoso orbital para la determinación de citocinas. Cada muestra fue centrifugada a 10000 rpm y se separó el sobrenadante el cual fue almacenado (-70°C) hasta el momento de su análisis. Para la determinación de IL-10, IL-6, TNF- α , se aplicó el método inmunoenzimático de ELISA de doble anticuerpo, utilizándose kits comerciales (ELISA Kit, Mouse, Thermo Fisher Scientific). Los resultados fueron leídos en un lector de ELISA a 450 nm de longitud de onda.

6.10. Estrés oxidativo

6.10.1. Determinación de GSH

Después de sacrificar a los animales se perfundieron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (fosfato potásico 0,15 M, NaCl al 0,9%, pH 7,4) para eliminar los elementos sanguíneos residuales. Se retiraron fragmentos de hígado, se lavaron en solución salina fría y se almacenaron con PBS a -70°C hasta su utilización.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: de cada tejido se tomó 0.1 g con 1 mL de PBS, fueron colocados en un homogenizador eléctrico, se dejó reposar en hielo durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.3 mL, se le agregó 0.7 mL del PBS, se mezcló y enseguida se le adicionó 2 mL de solución tamponada TRIS pH 8.9, se hidrató el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) con alcohol metílico y se agregó a cada tubo 50 µL, se mezclaron todos los tubos; se dejaron reposar durante 5 min. Se leyó la absorbancia a 412 nm (Díaz *et al.*, 2012).

6.10.2. Determinación de GSSG

Se prepararon homogeneizados de hígado al 10% (p/v) en amortiguador PBS 0.1 M, pH 7.5. Se tomaron alícuotas de los homogeneizados y se trataron con 1-metil-2trifluorometanosulfonato vinilpiridinium 1 (M2VP) 10 mM y se almacenaron a 70 °C hasta su uso.

La determinación se realizó mediante un método enzimático (Teitze, 1969), el cual emplea M2VP para derivatizar al GSH sin interferir con la GR presente en el ensayo. GSSG es reducido a GSH, y a su vez cuantificado con el reactivo de DTNB. La reducción es catalizada por la GR en presencia de NADPH. El ensayo utiliza el cambio en el desarrollo de color durante la reacción el cual es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSG. Los reactivos utilizados en la prueba son: amortiguador stock de Na₃PO₄ 143 mM y EDTA 6 mM a pH 7.5; amortiguador preparado al día (NADPH 0.248 mg/mL disuelto en amortiguador stock), DTNB 6 mM; GR 173 U/mg proteína. Procedimiento: en un tubo eppendorf se agregaron los siguientes reactivos: DTNB (100 µL), muestra o estándar 100 µL, se homogenizó y añadió la GR para iniciar el ensayo se adiciono 100 µL de NADPH. La formación de 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) fue

monitoreado a 412 nm. De esta manera se pudo determinar la relación GSH/GSSG y GSH+GSSG.

6.10.3. Actividades de la GPX y GR

Para la cuantificación de GPx y GR se tomaron alícuotas de los sobrenadantes de homogeneizados de hígado al 10% (p/v) en amortiguador PBS 0.1 M, pH 7.5. La cuantificación se realizó mediante la producción de NADP⁺. Para la determinación de GPx la reacción se llevó a cabo en: Tris-HCl (pH 8, 0.1 mM), GSH (20 mM), NADPH (0.25 mM), GR (0.5 U/mL) y terbutil-hidroperóxido (75 μM), adicionando 30 μL de muestra. En el caso de la determinación de la actividad de GR la mezcla fue conformada por: Tris (pH 8, 140 mM), EDTA (5 mM), GSSG (50 mg/mL) y NADPH (10 mg/mL) con 50 μL de muestra. En ambos casos se midió la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos. La actividad de ambas enzimas se mide por la oxidación de NADPH a NADP⁺ que es acompañado por un decremento en la absorbancia a 340 nm (Díaz *et al.*, 2012). En el caso de GR la oxidación del NADPH es directa, mientras que la actividad de GPx es determinada indirectamente por un acoplamiento con la actividad de GR que se lleva a cabo con la formación de NADP⁺ (Figura 8).

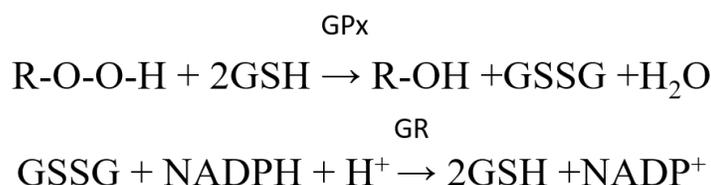


Figura 8. Reacciones para la determinación de GPx. La GPx cataliza la reducción del H₂O₂ o L-OOH, utilizando como sustrato el GSH para la transformación de GSSG y con el acoplamiento de la actividad de GR se lleva a cabo la oxidación de NADPH + H⁺, con cambios en la absorbancia.

6.10.4. Método para cuantificar sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hígado

Se prepararon homogeneizados de hígado al 10 % (p/v) en un amortiguador de PBS 0.1 M y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. El grado de lipoperoxidación se evaluó como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante una técnica espectrofotométrica (Kikugawa *et al.*, 1992). El fundamento del método se basa en la reacción producida entre el ácido

tiobarbitúrico (TBA) y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído (MDA), lo que origina TBARS que puede medirse mediante espectrofotometría. Se preparó una curva estándar de MDA se preparó con 1,1,3,3-tetrametoxipropano. A 200 μL de muestra o de estándar se le adicionó 25 μL de TBA, se homogenizo e incubo a 90 $^{\circ}\text{C}$, después de 60 min se enfrió a temperatura ambiente y adicionó 400 μL de n-butanol, se homogenizo en vortex, se centrifugó 6000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue separado y se leyó absorbancia a 535 nm.

7. Resultados y Discusión

7.1. Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos polifenólicos totales de los EA del muérdago *C. loniceroides* se muestra en la tabla 1, las extracciones se realizaron por los métodos de ebullición y maceración.

Tabla 1. Rendimiento de polifenoles totales en cada extracto de harina de muérdago.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	64.51 ±3.66 ^b	92.4 ±1.00 ^a	54.11 ±2.68 ^c	49.36 ±1.28 ^a	37.15 ±0.92 ^b	17.63 ±1.36 ^c
Tallo	75.1 ±1.62 ^b	96.3 ±3.90 ^a	74.5 ±1.94 ^b	47.12 ±1.28 ^a	44.72 ±0.48 ^a	38.59 ±1.20 ^c
Fruto verde	26.53 ±1.58 ^a	25.36 ±1.58 ^a	25.01 ±1.39 ^a	21.36 ±0.80 ^a	19.49 ±1.91 ^a	10.27 ±2.13 ^b
Fruto maduro	22.43 ±0.49 ^a	17.09 ±0.65 ^b	21.47 ±0.40 ^a	16.93 ±0.24 ^a	15.44 ±0.55 ^b	9.63 ±0.61 ^c

* Los resultados están expresados en ácido gálico (mg/L)

Se encontró que la mayor concentración de compuestos polifenólicos de *C. loniceroides* está en hoja y tallo, los cuales se lograron extraer mediante agua a ebullición durante 60 min, por lo que los polifenoles presentes son hidrosolubles. En este caso es importante conocer la concentración de compuestos polifenólicos, ya que los fitoquímicos, en especial los compuestos fenólicos están recibiendo creciente atención debido a sus actividades biológicas (Cho *et al.*, 2003), se ha reportado que este tipo de compuestos juegan un papel importante en la modulación de la actividad α -glucosidasa y α -amilasa, por lo tanto, pueden contribuir al manejo de la diabetes tipo 2, y en este estudio los compuestos fenólicos constituyen el principal grupo de compuestos que actúan como antioxidantes.

En el caso de los frutos verde y maduro se logró una mayor extracción también por el método de ebullición, para el fruto verde el tiempo de ebullición no influyo en la extracción de polifenoles, ya que la concentración se mantuvo constante. Por otro lado, con el método de maceración se encontró que la concentración de polifenoles totales es menor a la del método de ebullición. Varios estudios han encontrado que la elevación de la temperatura de extracción desde la temperatura ambiente a 90 °C muestra una correlación positiva con el rendimiento de la extracción (Chew *et al.*, 2011). Sin embargo, temperaturas superiores a 100 °C pueden causar una reducción significativa en rendimiento de extracción (Mukhopadhyay, 2006). Las altas

temperaturas de extracción ayudan a mejorar la eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos por el reblandecimiento de los tejidos de la planta, lo que debilita la pared celular (Juntachote *et al.*, 2006).

La extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas también está influenciada por la duración de la extracción, que puede afectar a la solubilización de estos compuestos. Largos tiempos de extracción pueden aumentar las posibilidades de oxidación de los compuestos fenólicos, provocando que disminuyan, al ceder y cambiar la conformación de los polifenoles extraídos (Dai & Mumper, 2010). Debido a los largos tiempos que se usaron en el método de maceración, el rendimiento de compuestos fenólicos disminuyó.

7.2. Cuantificación de taninos condensados

Esta determinación se realizó con el fin de conocer la concentración de taninos condensados (Tabla 2), a medida que se van cambiando las condiciones de extracción; tiempo y temperatura. Para los tiempos de 30 a 90 min la temperatura fue a ebullición y de 24 a 72 h la temperatura fue a 23 ± 2 °C.

Tabla 2. Concentración de taninos de los extractos crudos de hojas, tallos y frutos de *C. loniceroides*.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	6.55 \pm 0.02 ^a	6.31 \pm 0.48 ^a	6.48 \pm 0.16 ^a	2.80 \pm 0.17 ^b	3.58 \pm 0.05 ^a	1.26 \pm 0.00 ^c
Tallo	5.51 \pm 0.04 ^a	5.47 \pm 0.02 ^a	5.75 \pm 0.10 ^b	5.79 \pm 0.01 ^a	5.64 \pm 0.01 ^a	5.40 \pm 0.01 ^a
Fruto verde	13.14 \pm 0.16 ^a	12.75 \pm 0.10 ^a	10.83 \pm 0.32 ^b	8.00 \pm 0.16 ^a	7.01 \pm 0.02 ^b	7.23 \pm 0.03 ^b
Fruto maduro	11.21 \pm 0.26 ^a	10.67 \pm 0.02 ^a	10.27 \pm 0.42 ^b	9.78 \pm 0.18 ^a	6.14 \pm 0.08 ^b	5.43 \pm 0.28 ^c

* Los resultados están expresados en mg catequina (CAT)/ g de muestra seca.

Se encontró por ambos métodos que los EA de fruto maduro y verde tienen una mayor concentración de taninos condensados que los extractos de hoja y tallo, además se observa que la concentración de taninos en los extractos de fruto verde, hoja y tallo se mantiene constante durante el tiempo, sin embargo, la concentración de taninos en el fruto maduro disminuye con el tiempo de extracción. Por los resultados previos encontrados por Serrano Maldonado; era de esperar que los extractos con mayor contenido de taninos condensados fueran los de fruto verde.

La concentración de taninos condensados de los extractos obtenidos a temperatura ambiente fue significativamente menor a la de los extractos obtenidos por ebullición ($p < 0.05$), excepto para el extracto de tallo, ya que la concentración no se afecta con el tiempo y temperatura ($p < 0.05$). Se sabe que la mayoría de los frutos verdes contiene una mayor concentración de taninos condensados, y al ir madurando la concentración va disminuyendo (Goldstein & Swain, 1963; Wrangham & Waterman, 1983). La concentración de estos compuestos es importante en esta investigación; ya que se sabe que en análisis *in vitro* han indicado que los taninos condensados de sorgo sobreviven a la digestión gástrica simulada e inhiben las amilasas digestivas cuando se encapsulan en micropartículas de proteína de kafirina de sorgo (SCT-KEMS), por lo que SCT-KEMS es como un potencial agente nutracéutico antihiper glucemiante *in vivo* (Links *et al.*, 2016). También se sabe que los taninos condensados pueden trabajar de manera sinérgica para inhibir la α -amilasa (Tan *et al.*, 2017)

7.3. Cuantificación de flavonoides

En la tabla 3, se muestra la concentración de flavonoides de los EA obtenidos de las diferentes partes de la planta de muérdago. Se tomó Rutina (quercetina 3-rutinósido) como compuesto de referencia.

Tabla 3. Contenido de flavonoides para los extractos crudos de hojas, tallos y frutos de *C. loniceroides*.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	6.71 \pm 0.05 ^a	4.97 \pm 0.51 ^b	4.17 \pm 0.19 ^c	4.6 \pm 0.26 ^b	6.95 \pm 0.20 ^a	4.96 \pm 0.15 ^b
Tallo	8.36 \pm 0.11 ^{a,b}	7.92 \pm 0.15 ^b	8.68 \pm 0.14 ^{a,b}	6.67 \pm 0.18 ^b	7.99 \pm 0.18 ^a	7.26 \pm 0.18 ^{a,b}
Fruto verde	3.64 \pm 0.043 ^a	2.86 \pm 0.24 ^b	3.56 \pm 0.32 ^{a,b}	2.67 \pm 0.15 ^a	2.03 \pm 0.51 ^b	2.44 \pm 0.21 ^{a,b}
Fruto maduro	3.22 \pm 0.012 ^a	1.93 \pm 0.18 ^b	2.56 \pm 0.11 ^{a,b}	1.56 \pm 0.09 ^b	1.68 \pm 0.14 ^{a,b}	1.90 \pm 0.07 ^a

* Los resultados están expresados en mg rutina / mL.

De acuerdo con los resultados obtenidos el tallo es el que contiene mayor concentración de flavonoides seguido de hoja, fruto verde y fruto maduro, siendo estos últimos los que presentan el menor contenido. Lo cual coincide con lo reportado por Serrano *et al.*, (2011), en hoja de *C. loniceroides* (8.26 mg eq. rutina / g) y tallo (9.19 mg eq. rutina / g).

Los flavonoides son una clase compuestos fenólicos abundantes en la naturaleza con varias actividades biológicas. Ellos comparten un esqueleto estructural común que consta de dos anillos aromáticos (A y B) vinculados a través de tres átomos de carbono unidos al anillo A, que forma un heterociclo oxigenado (anillo C) y se dividen en grupos (Figura 9).

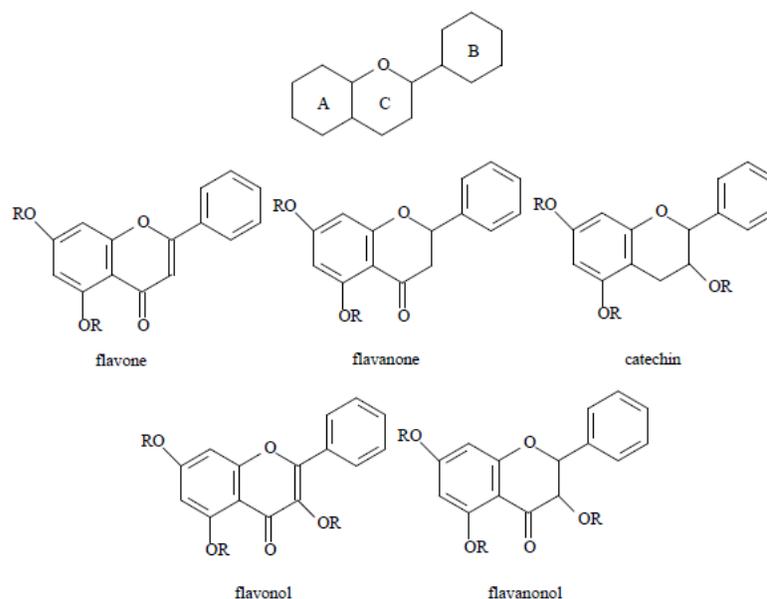


Figura 9. Flavonoides

Se ha encontrado que los flavonoides tienen potencial de inhibición de α -amilasa humana, que se correlaciona con el número de grupos hidroxilo en el anillo B de la cadena de flavonoide. La interacción se produce con la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en la posición R6 o R7 del anillo A y la posición R4 'o R5' del anillo B de los ligandos de polifenol y los residuos catalíticos del sitio de unión, que estabiliza la interacción con el sitio activo (Lo Piparo *et al.*, 2008). Estos resultados están en general de acuerdo con el mecanismo de acción propuesto para la acarbosa (Brownlee, 2005).

7.4. Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)

Los resultados del poder antioxidante *in vitro* son expresados como μmol de reducción de hierro/poder antioxidante (el valor FRAP) / g de muestra seca de muérdago. En la tabla 4, se muestran los resultados obtenidos para los métodos de ebullición y maceración, respectivamente. Para el estudio de estabilidad del antioxidante en los extractos de muérdago,

se mantuvieron a 4 °C durante 48 h. Posteriormente, los extractos fueron re-analizados por duplicado y los resultados se compararon con los obtenidos en las muestras frescas.

Tabla 4. Ensayo FRAP para los extractos crudos de hojas, tallos y frutos de *C. loniceroides*.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	2340.0 ±11.00 ^c	1908 ±8.31 ^c	2510.4 ±75.63 ^d	1360.4 ±38.25 ^b	1064 ±17.55 ^c	1056.4 ±68.96 ^c
Tallo	1800.0 ±60.38 ^b	2368.8 ±12.47 ^d	2196 ±58.93 ^c	1702.4 ±46.23 ^c	1641.6 ±63.28 ^d	1915.2 ±45.60 ^d
Fruto verde	575.6 ±8.11 ^a	651 ±2.78 ^b	577.5 ±6.67 ^b	393.68 ±13.17 ^a	364.04 ±12.47 ^b	255.36 ±6.84 ^b
Fruto maduro	561.6 ±5.10 ^a	389.9 ±15.08 ^a	411.6 ±5.25 ^a	327.56 ±2.19 ^a	257.64 ±0.88 ^a	198.36 ±0.44 ^a

* Los resultados están expresados en $\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}/\text{g}$.

Para la relación entre el poder antioxidante y la cantidad de polifenoles de los extractos de muérdago, los valores de FRAP y el contenido de polifenoles totales de las hojas, tallo, fruto verde y maduro de muérdago se compararon en un experimento por separado. Esta relación se muestra en las figuras del APENDICE D. Cada punto representa el promedio del valor de FRAP (n=3).

Se sabe que los polifenoles del té se unen a iones metálicos (Miller *et al.*, 1993; Paganga *et al.*, 1996; Van Acker *et al.*, 1996), esta propiedad no interfiere con la medición del poder antioxidante utilizando el ensayo FRAP, esto se demostró por una respuesta lineal, para el caso de los extractos de muérdago hubo una fuerte correlación entre el valor FRAP y el contenido total de compuestos fenólicos de los extractos de hoja, tallo, fruto maduro y fruto verde.

7.5. Inhibición del radical catiónico ABTS

En la Tabla 5, se muestra el valor de EC₅₀ expresado en mg Trolox/mL para el radical ABTS-persulfato que presentan los diferentes extractos de muérdago, obtenidos por ebullición (30, 60 y 90 min) y maceración (12, 24 y 48 h).

Se observa en todos los casos que los extractos obtenidos por el método de ebullición tienen una mejor respuesta de inhibición del radical ABTS-persulfato, principalmente a los 30 min, especialmente; para los extractos de tallo (EC₅₀=17.66±0.8 mg trolox/mL) y para el extracto de hoja a los 30 min (EC₅₀=16.37±1.52 mg trolox/mL).

Tabla 5. Valor de EC₅₀ para inhibir el radical ABTS-persulfato de extractos de muérdago.

	Ebullición						Maceración					
	30 min		60 min		90 min		12 h	24 h	48 h			
Hoja	16.37	±1.52 ^a	27.66	±0.66 ^b	33.64	±1.33 ^c	58.53	±2.48 ^a	85.44	±1.76 ^a	56.37	±0.19 ^a
Tallo	17.66	±0.8 ^a	28.67	±0.22 ^b	46.38	±1.51 ^c	53.04	±2.02 ^a	74.18	±2.72 ^b	52.97	±0.46 ^a
Fruto verde	46.60	±0.95 ^a	46.91	±1.15 ^a	49.41	±2.22 ^a	66.78	±3.13 ^a	81.34	±1.08 ^a	138.25	±6.21 ^a
Fruto maduro	37.29	±0.57 ^a	58.62	±2.67 ^b	66.77	±1.53 ^c	70.24	±3.43 ^a	100.69	±22.66 ^a	94.82	±1.60 ^a

* Los resultados están expresados en mg Trolox / mL.

7.6. Inhibición del radical DPPH

La evaluación del valor EC₅₀ para los extractos de muérdago, el cual se refiere a la concentración de muestra expresada en mg ácido gálico (AG)/mL, necesaria para inhibir el 50% del radical DPPH, se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de EC₅₀ del radical DPPH• de cada extracto de muérdago.

	Ebullición						Maceración					
	30 min		60 min		90 min		12 h	24 h	48 h			
Hoja	2.71	±2.04 ^a	2.82	±1.51 ^a	5.32	±0.42 ^a	4.7	±0.07 ^a	10.27	±0.08 ^b	27.12	±0.57 ^c
Tallo	5.08	±0.43 ^a	5.11	±0.03 ^c	6.00	±0.05 ^b	6.40	±0.70 ^a	8.49	±0.34 ^b	10.28	±0.71 ^b
Fruto verde	4.59	±0.38 ^a	7.46	±0.09 ^{d,e}	7.97	±0.12 ^c	5.24	±0.37 ^a	8.13	±0.38 ^b	10.31	±0.32 ^b
Fruto maduro	5.09	±0.12 ^a	5.39	±0.23 ^{a,b}	6.09	±0.25 ^b	9.08	±0.16 ^a	8.97	±0.10 ^b	10.43	±0.36 ^b

* Los resultados están expresados en mg AG/mL.

Los extractos de las diferentes partes de la planta de muérdago presentan un valor de EC₅₀ menor cuando se obtienen por ebullición, siendo los extractos de tallo y hoja los que presentan una mejor respuesta de inhibición del radical DPPH, con valores entre 2.71 – 5.32 mg AG/mL.

7.7. Poder reductor

Para la determinación del poder reductor del ion Fe²⁺ se utilizó ácido ascórbico como compuesto de referencia, en un rango de concentraciones de 0.01 a 0.1 mg/mL en intervalos de 0.02 mg/mL. Se ajustaron estas mismas concentraciones de polifenoles totales en miligramos equivalentes de ácido gálico, para cada muestra y así comparar la reducción del ion Fe²⁺. Los resultados

obtenidos para los extractos de fruto verde, fruto maduro, tallo y la hoja se muestran en la figura 10.

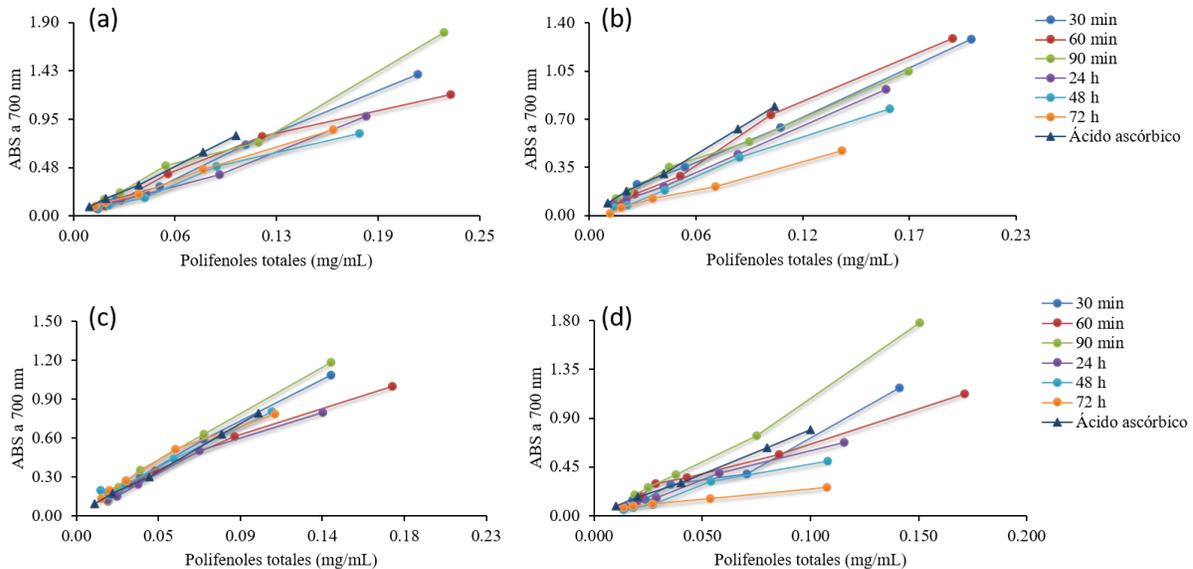


Figura 10. Poder reductor de diferentes extractos de muérdago *C. loniceroides*. (a) Fruto verde, (b) Fruto maduro, (c) Tallo y (d) Hoja.

El poder reductor se determinó por la relación de concentración de polifenoles, determinados por el método de Folin-Ciocalteu; versus la absorbencia a 700 nm. Una gráfica ascendente refleja una capacidad de reducción del Fe^{2+} . Todos los extractos presentaron poder reductor, mostrando una mejor respuesta aquellos extractos obtenidos por ebullición. Los extractos de fruto verde y hoja presentaron un mejor poder reductor los cuales fueron obtenidos por ebullición durante 90 min, incluso presentaron mayor poder reductor que del ácido ascórbico utilizado como referencia.

7.8. Actividad quelante de Fe^{2+}

La actividad quelante que presentan los extractos, se determina por el comportamiento ascendente del porcentaje de quelación del metal con respecto a la concentración de polifenoles totales. Se tomó como referencia la actividad quelante del EDTA (usado como antioxidante en la industria por su potente actividad de quelación). Los valores de EC_{50} obtenidos para hoja, tallo, fruto maduro y verde, obtenidos por ebullición y maceración se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de EC₅₀ obtenidos de la actividad quelante de hierro de extractos.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	0.75 ±0.1 ^a	1.06 ±0.03 ^b	1.48 ±0.02 ^b	0.18 ±0.04 ^a	0.45 ±0.06 ^a	0.83 ±0.14 ^a
Tallo	1.60 ±0.017 ^a	1.65 ±0.04 ^{a,b}	1.67 ±0.06 ^b	1.84 ±0.01 ^a	1.20 ±0.06 ^a	1.98 ±0.05 ^a
Fruto verde	6.61 ±0.24 ^a	7.77 ±0.15 ^b	8.11 ±0.08 ^b	6.56 ±0.54 ^a	5.42 ±0.08 ^a	10.60 ±1.89 ^b
Fruto maduro	5.29 ±0.08 ^a	6.91 ±0.27 ^b	7.78 ±0.54 ^c	8.68 ±0.74 ^b	7.44 ±0.12 ^b	3.77 ±0.17 ^a
EDTA	8 µg/ml					

¹Las letras indican diferencias significativas entre columnas dentro de una misma fila (Tuckey; $p \leq 0.05$).

Los extractos de muérdago presentaron capacidad quelante, ya que siguieron una dependencia entre la concentración de polifenoles totales y el porcentaje de quelación, misma tendencia que sigue el EDTA tomado como referencia. Sin embargo, los extractos requieren concentraciones de un orden de magnitud superior al EDTA, para tener el mismo efecto.

Los extractos de hoja y tallo en ambos casos mostraron mejor capacidad de quelar el Fe²⁺, en el caso de los extractos obtenidos por maceración, la capacidad quelante disminuyó, posiblemente porque durante este proceso de extracción se destruyen los compuestos que tienen esta capacidad y que están presentes en los otros extractos.

La ferrozina puede formar complejos con Fe²⁺, de manera cuantitativa. Sin embargo, en la presencia de agentes quelantes, se interrumpe la formación del complejo dando como resultado la disminución del complejo de color púrpura y por tanto una disminución del color. La medición de la reducción de color, por lo tanto, permitió la estimación de la actividad quelante. El ion metálico de transición, Fe²⁺; posee la capacidad para intercambiar los electrones individuales lo que permite la formación y propagación de muchas reacciones de radicales, incluso a partir de los radicales relativamente no reactivos (AbouL-Enein *et al.*, 2003). La principal estrategia para evitar la generación de ROS está asociada con la capacidad quelante de los iones metálicos. El extracto de hoja obtenido por maceración 12 h, fue el más activo, el que interfirió con la formación de complejo ferroso y ferrozina, lo que sugiere que tiene actividad quelante y captura de iones ferrosos antes que la ferrozina. El valor EC₅₀ del extracto para la

actividad quelante fue $0.18 \pm 0,04$ mg/mL, que es mayor que el estándar positivo de EDTA ($EC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$).

7.9. Inhibición enzimática *in vitro*

7.9.1. Actividad inhibitoria de α -amilasa

La actividad inhibitoria de α -amilasa se expresa en valores de IC_{50} que se muestran en la Tabla 8. El IC_{50} se define como la concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima.

Tabla 8. Evaluación de la actividad inhibitoria de α -amilasa de extractos de muérdago.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	*	*	*	*	*	*
Tallo	*	*	*	*	*	*
Fruto verde	1.73 \pm 0.11 ^{a1}	4.95 \pm 0.07 ^b	3.25 \pm 1.17 ^{b,c}	8.14 \pm 0.42 ^a	14.78 \pm 2.56 ^b	40.25 \pm 0.55 ^c
Fruto maduro	5.85 \pm 0.05 ^a	6.69 \pm 0.18 ^b	9.52 \pm 0.31 ^b	6.63 \pm 0.50 ^a	23.96 \pm 0.01 ^b	52.85 \pm 1.92 ^c

Los resultados de IC_{50} están expresados en concentración μg de extracto / mL

* No hubo actividad inhibitoria de la enzima

¹ Las letras indican diferencias significativas entre columnas dentro de una misma fila (Tuckey; $p \leq 0.05$).

Los extractos crudos de fruto verde y fruto maduro obtenidos por ebullición durante 30 min fueron los más activos inhibiendo la α -amilasa, ya que fueron los extractos con el valor más bajo de IC_{50} $1.73 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ y $5.85 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. La inhibición de α -amilasa por los extractos de fruto verde y fruto maduro va disminuyendo al aumentar el tiempo de ebullición, es decir que posiblemente a periodos prolongados de extracción y la alta temperatura van degradando a los polifenoles capaces de inhibir la enzima. En contraste con estos resultados, los extractos de hoja y tallo obtenidos por los dos métodos no fueron capaces de inhibir la actividad de la α -amilasa (Tabla 8). Se analizó un control positivo junto con los extractos; se usó como inhibidor específico acarboxa el cual tuvo un valor de IC_{50} de $7.1 \mu\text{g/mL}$. Los polifenoles presentes en los extractos de fruto verde y fruto maduro tuvieron correlación lineal ($p < 0.05$) con coeficientes de correlación de 0.882 (Figura 11b) y 0.907 (Figura 11a), respectivamente. El coeficiente de determinación indica que alrededor del 77.8% de la

inhibición de α -amilasa en EA de fruto verde y el 82% de la actividad inhibitoria de la α -amilasa en EA de frutos maduros es debida al contenido de los polifenoles en los extractos.

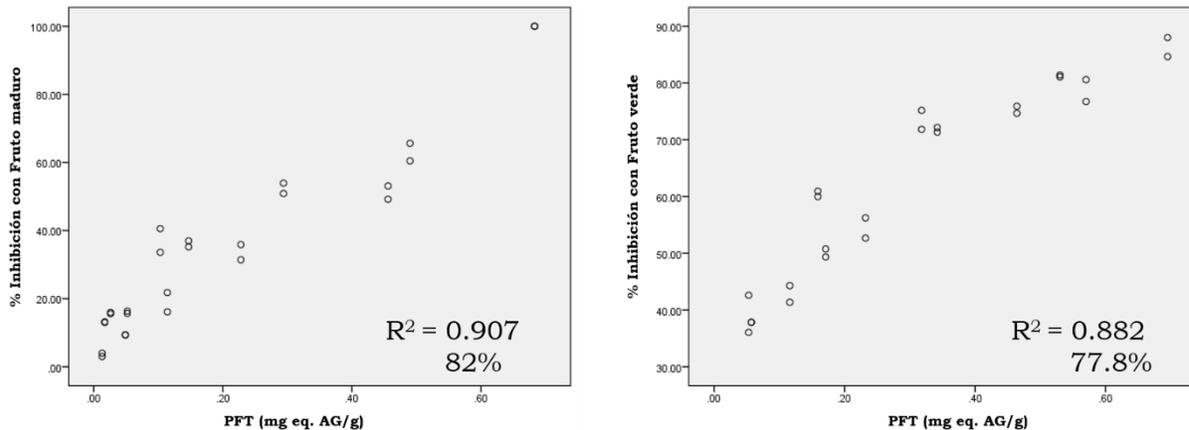


Figura 11. Gráfica de correlación lineal ($p < 0.05$) de concentración de polifenoles totales de *C. lonicerooides* y % de Inhibición de α -amilasa. (a) Concentración de polifenoles totales del EA de fruto maduro. (b) Concentración de polifenoles totales del EA de fruto verde.

Los extractos obtenidos por maceración también tuvieron actividad inhibitoria de α -amilasa, sin embargo, esta actividad fue aproximadamente entre 2 y 8 veces menor que la actividad inhibitoria de los extractos obtenidos por ebullición. Los extractos de ambos frutos obtenidos por maceración durante 24 h tuvieron la misma actividad inhibitoria de la enzima, pero a mayor tiempo de extracción los compuestos capaces de inhibir se van degradando, esto se ve reflejado en el aumento del IC_{50} . Se evaluó la actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa de los extractos de *C. lonicerooides*, sin embargo solo los frutos maduro y verde presentaron inhibición de forma dependiente de la concentración, a continuación se muestran los valores de IC_{50} (Tabla 8).

Hay informes que establecen que los compuestos fenólicos vegetales modulan la hidrólisis de los carbohidratos por la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (McDougall *et al.*, 2005). Varios efectos biológicos y benéficos para la salud han sido demostrados por los compuestos fenólicos en plantas. Otro factor que se podría considerar es la presencia de mucilago en los frutos. Se sabe que los mucilagos tienen un efecto benéfico para reducir los niveles de glucosa en sangre. Los mucilagos, debido a su naturaleza polisacárida, producen un

número indefinido de oligosacáridos en la hidrólisis (Ameri *et al.*, 2015; Hajian *et al.*, 2016; Prajapati *et al.*, 2013). La acarbosa, también un oligosacárido pero de origen bacteriano, capaz de inhibir la α -glucosidasa, por lo que es usada como medicamento para tratar la diabetes mellitus tipo 2 (Sales *et al.*, 2012).

Posteriormente para obtener mayor información sobre la inhibición se determinó la velocidad inicial [V] de las reacciones de hidrólisis catalizada por la α -amilasa pancreática en diversas concentraciones de sustrato [S] en presencia y ausencia de los compuestos fenólicos de los extractos de los frutos [I], como se indica en la figura 11 a y b. Las gráficas de dobles recíprocos (Figura 12a y 12b) muestran que las líneas rectas que se interceptan en el eje "Y". La pendiente aumenta al aumentar la concentración de compuestos fenólicos. Estos resultados indican que la unión de los compuestos fenólicos no afectó a la velocidad de reacción catalizada por la α -amilasa, pero sí se modifica la K_m . Indicando que es un inhibidor competitivo. La inhibición competitiva podría ser debido a los taninos condensados, ya que se encuentran en mayor concentración en los frutos.

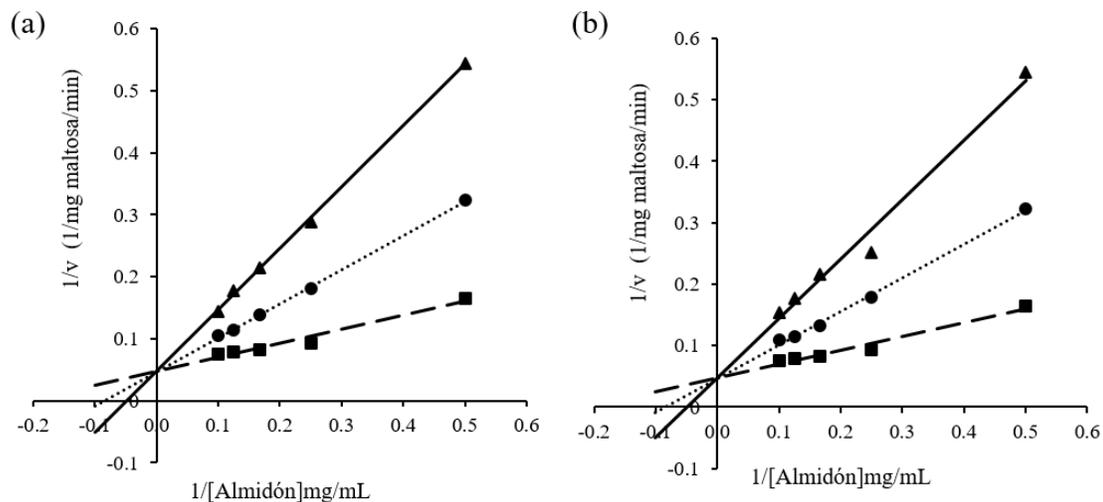


Figura 12. Grafica de doble-recíproco de la velocidad inicial v de las reacciones de hidrólisis catalizadas por α -amilasa a diferentes concentraciones de almidón en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto de *C. loniceroides*. (a) Las concentraciones del fruto maduro por 30 min de ebullición fueron de (■) 0 mg/mL, (●) 3.7 mg/mL y (▲) 8.3 mg/mL. (b) Las concentraciones del fruto verde por 30 min de ebullición fueron de (■) 0 mg/mL, (●) 2.9 mg/mL y (▲) 5.7 mg/mL.

La α -amilasa es una de las enzimas responsables de la hidrólisis del almidón, produciendo azúcares simples como glucosa y maltosa. La inhibición de esta enzima por los EA de los frutos de *C. loniceoides*, podría retardar la digestión de carbohidratos y reducir la velocidad de absorción de glucosa, y consecuentemente podría disminuir los niveles de glucosa postprandial en sangre. Los parámetros cinéticos de la enzima determinados por diagramas de Lineweaver-Burk, se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la inhibición de α -amilasa con extractos de frutos de *C. loniceoides*.

Extracto	$\mu\text{g/mL}$	K_m (mg/mL)	V_{\max} (mg/min)	K_i' ($\mu\text{g/mL}$)	Tipo de Inhibición
Sin extracto	0	4.8	21.2	-	
Fruto Maduro 30 min	3.7	11.7	21.2	2.4	Competitiva
	8.3	20.6	20.8		
Fruto verde 30 min	1.25	11.8	21.5	0.71	Competitiva
	2.5	20.6	21.3		

7.9.2. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa

El efecto de los EA de *C. loniceoides* sobre la inhibición de la α -glucosidasa se muestra en la Tabla 10. Los resultados son expresados en valores de IC_{50} .

Tabla 10. Evaluación de la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de extractos de muérdago.

	Ebullición			Maceración		
	30 min	60 min	90 min	12 h	24 h	48 h
Hoja	37.92 \pm 4.83 ^{a1}	75.25 \pm 3.67 ^b	117.49 \pm 1.12 ^c	178.92 \pm 13.02 ^b	95.78 \pm 2.24 ^a	158.95 \pm 6.25 ^b
Tallo	14.71 \pm 0.43 ^a	82.51 \pm 1.88 ^{bc}	114.50 \pm 7.21 ^{cd}	56.90 \pm 0.66 ^a	53.69 \pm 2.1 ^a	100.02 \pm 0.56 ^b
Fruto verde	159.96 \pm 21.19 ^b	116.40 \pm 5.23 ^a	170.07 \pm 0.95 ^b	195.78 \pm 6.93 ^a	469.65 \pm 4.35 ^b	543.65 \pm 4.03 ^c
Fruto maduro	168.95 \pm 11.24 ^a	307.60 \pm 17.39 ^b	386.15 \pm 34.86 ^b	462.95 \pm 4.35 ^a	680.87 \pm 55.74 ^b	1030.75 \pm 30.36 ^f
Acarbosa	31					

* Los resultados de IC_{50} están expresados en concentración μg de extracto / mL

¹ Las letras indican diferencias significativas entre columnas dentro de una misma fila (Tuckey; $p \leq 0.05$).

Los inhibidores más activos de α -glucosidasa fueron los extractos de tallo (IC_{50} 14.71 \pm 0.43 $\mu\text{g/mL}$) y hoja (IC_{50} 37.92 \pm 4.83 $\mu\text{g/mL}$) obtenidos con 30 min de ebullición, esta actividad fue superior a los extractos de los frutos verdes (IC_{50} 159.96 \pm 21.19 $\mu\text{g/mL}$) y maduros (IC_{50} 168.95 \pm 11.24 $\mu\text{g/mL}$) a esas mismas condiciones. Los extractos crudos de fruto verde a los diferentes tiempos lograron inhibir aproximadamente 2 veces más que los frutos maduros, además la

actividad inhibitoria de α -glucosidasa se mantiene constante con los extractos que fueron obtenidos por ebullición hasta los 60 min. En los extractos obtenidos por maceración se observó la misma tendencia, los extractos de fruto verde tuvieron mayor actividad, es decir lograron mayor inhibición de la α -glucosidasa que los extractos de las demás partes de la planta. En contraste la acarbosa mostro un valor IC_{50} de $31\mu\text{g/mL}$.

Los polifenoles presentes en los extractos de hoja y tallo tuvieron correlación lineal ($p < 0.05$) con coeficientes de correlación de 0.83 (Figura 13a) y 0.84 (Figura 13a), respectivamente. El coeficiente de determinación indica que alrededor del 69% de la inhibición de α -glucosidasa en EA de hoja y el 70% de la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa en EA de tallo es debida al contenido de los polifenoles en los extractos.

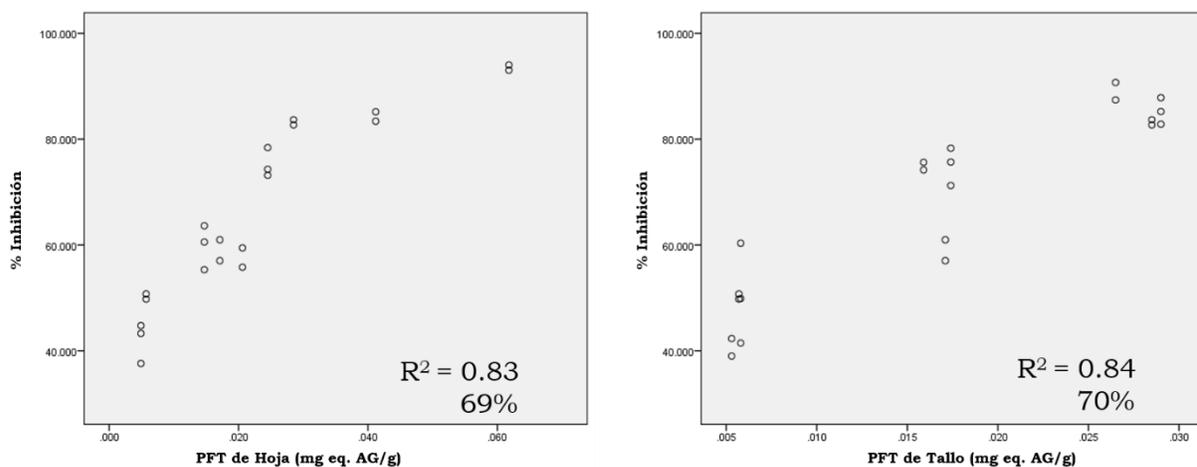


Figura 13. Gráfica de correlación lineal ($p < 0.05$) de concentración de polifenoles totales de *C. loniceroides* y % de Inhibición de α -glucosidasa. (a) Concentración de polifenoles totales del EA de hoja. (b) Concentración de polifenoles totales del EA de tallo.

Las enzimas glucosidasas localizadas en los vellos de la superficie de la membrana intestinal son enzimas clave en la digestión de carbohidratos. La administración oral de inhibidores de glucosidasas retarda la digestión y absorción de carbohidratos y modulan así, la elevación de la glucosa postprandial en sangre. Por ello en este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de la enzima α -glucosidasa de los extractos de *C. loniceroides*, los cuales presentaron inhibición de

forma dependiente de la concentración. Se analizó el comportamiento cinético durante la hidrólisis del pNPG por el método de doble recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 14).

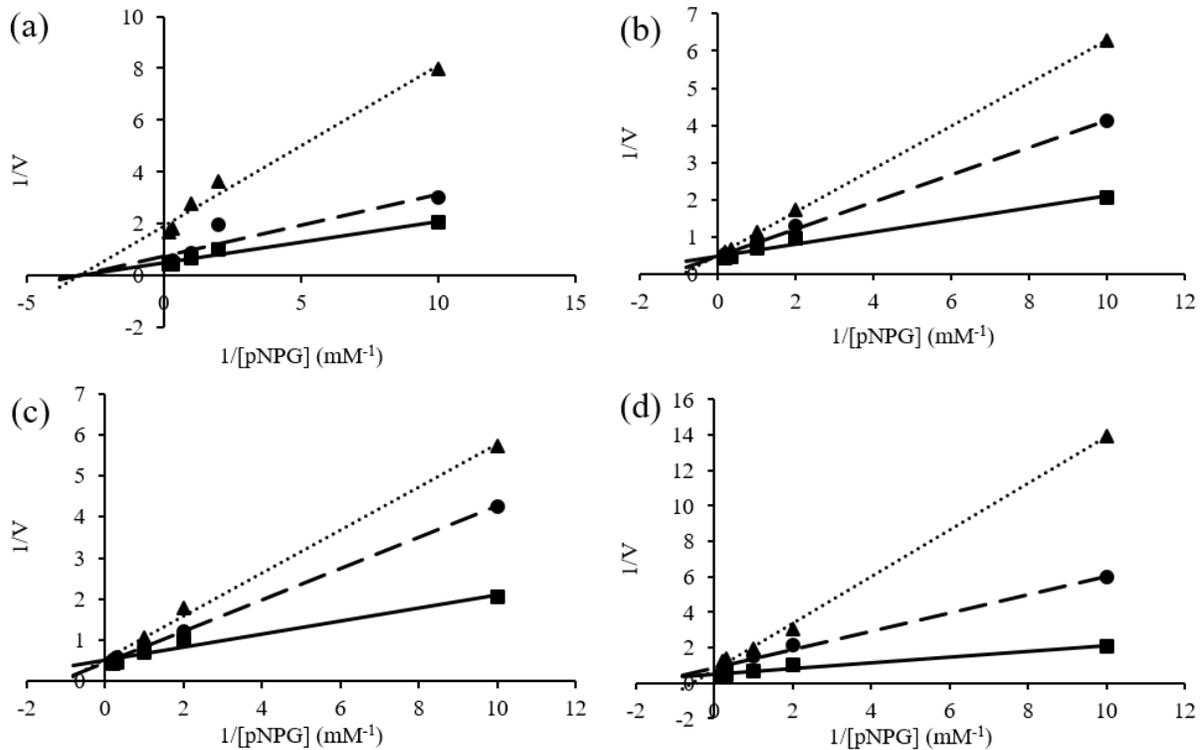


Figura 14. Grafica de doble-recíproco de la velocidad inicial v de las reacciones de hidrólisis catalizadas por α -glucosidasa a diferentes concentraciones de sustrato, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto de *C. loniceroide*s. (a) Las concentraciones del fruto maduro por 30 min de ebullición fueron de (■) 0 mg/mL, (●) 0.75 mg/mL y (▲) 1.5 mg/mL. (b) Las concentraciones del fruto verde por 30 min de ebullición fueron de (■) 0 mg/mL, (●) 0.37 mg/mL y (▲) 0.63mg/mL. (c) Las concentraciones de hoja por 30 min de ebullición fueron de (■) 0 mg/mL, (●) 0.075 mg/mL y (▲) 0.15 mg/mL. (d) Las concentraciones de tallo por 30 min de ebullición fueron de (■) 0 mg/mL, (●) 0.075 mg/mL y (▲) 0.15 mg/mL.

Se encontró que, al aumentar la concentración del extracto de fruto maduro obtenido por ebullición durante 90 min, no modificó la K_m de la α -glucosidasa, por otro lado, el valor de

V_{máx} decreció, esto se observa en la familia de líneas con diferentes pendientes con un intercepto común en el eje X (Figura 14a). Esta gráfica indica que el extracto es un inhibidor no-competitivo. Los parámetros cinéticos de la enzima determinados por diagramas de Lineweaver-Burk, se resumen en la tabla 10.

En el caso de los extractos de tallo por 30 min, fruto verde y hoja por 90 min se encontró que, al aumentar la concentración de los extractos, no se modificó la V_{máx} de la α -glucosidasa, por otro lado el valor de K_m fue en aumento, esto se observa en la familia de líneas con diferentes pendientes con un intercepto común en el eje Y (Figura 14 b, 14 c y 14 d). Lo que indica que estos extractos son inhibidores competitivos. Los parámetros cinéticos de la enzima determinados por diagramas de Lineweaver-Burk, se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de la inhibición de α -glucosidasa con extractos de frutos de *C. loniceroides*.

Extracto	$\mu\text{g/mL}$	K _m (μM)	V _{max} ($\mu\text{M/min}$)	K _{i'} ($\mu\text{g/mL}$)	Tipo de Inhibición
Sin extracto	0	326.45	2	-	
Fruto Maduro 30 min	0.75	323.3	1.3	0.05	No competitiva
	1.5	323.5	0.5		
Fruto verde 30 min	0.37	641.9	2.1	0.21	Competitiva
	0.63	2429.7	1.9		
Hojas 30 min	0.075	957.2	2.3	0.12	Competitiva
	0.15	997	1.9		
Tallo 30 min	0.075	636.9	2.05	0.01	Competitiva
	0.15	1781.9	2.0		

En los últimos años, los taninos se han reportado como inhibidores no específicos de varias enzimas hidrolíticas tales como lipasas, α -glucosidasas, α -amilasas y invertasa (Barrett et al., 2013; Gonçalves *et al.*, 2011; Grussu *et al.*, 2011; Ikarashi et al., 2011; Zajacz *et al.*, 2008). También, los taninos poseen actividad antioxidante (Riedl *et al.*, 2002). En este sentido, la actividad antioxidante y la actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa de *C. loniceroides*, parece ser debido, al menos en parte, a los polifenoles. La actividad inhibitoria de los taninos se atribuye generalmente a su capacidad de unirse muy fuertemente a los carbohidratos y las proteínas. Se ha sugerido que la interacción entre taninos, tales como el ácido químico y la α -amilasa humana depende de los grupos hidroxilo libres en los taninos que son capaces de

participar en puentes de hidrógeno (Kandra *et al.*, 2004). Esto parece una suposición razonable, pero se debe notar que no todos los taninos son capaces de inhibir α -amilasa (Sales *et al.*, 2012). En consecuencia, a pesar de la presencia grupos hidroxilo libres que pueden favorecer, en principio, la interacción de los taninos con proteínas, la simple presencia de esos grupos no es suficiente para asegurar que cualquier actividad inhibidora. Una conformación apropiada de la molécula de inhibidor combinado con grupos hidroxilo posicionados adecuadamente es quizás importante para la optimización de la inhibición.

Los resultados obtenidos en este trabajo dan pauta a seguir con la identificación de los compuestos responsables de la inhibición, ya que la acarbosa es un inhibidor competitivo de α -glucosidasa y puede utilizarse como monoterapia o en terapia combinada. Tiene un efecto probado a nivel clínico, se ha encontrado que disminuye los picos de hiperglucemia posprandial, y ha sido efectivo en el tratamiento de los estados prediabéticos para retrasar el inicio de la DM 2 y reducir la frecuencia de eventos cardiovasculares (Chiasson *et al.*, 2003).

7.10. Actividad antihyperglucemiante

Después del ayuno de 12 horas los niveles de glucosa de los animales en estudio no mostraron diferencia significativa entre los distintos grupos, considerándose es punto el tiempo 0 del estudio antihyperglucemiante (Figura 15).

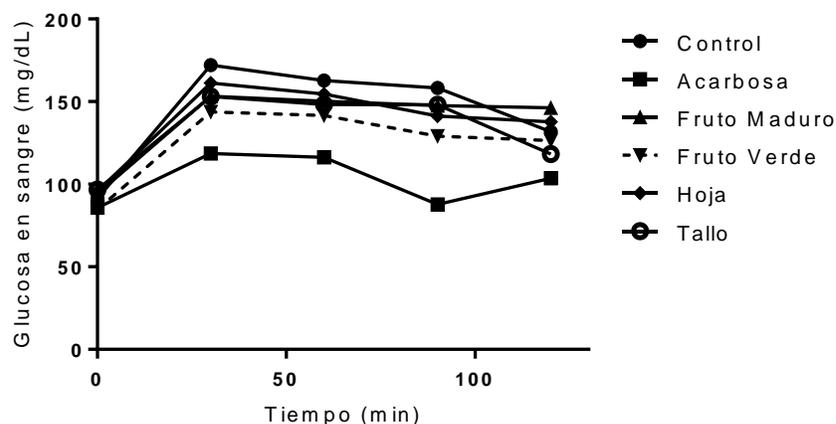


Figura 15. Evaluación de la actividad de la α -amilasa durante la administración de *C. loniceroides* y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.

Los animales testigo mostraron picos hiperglucémicos a los 60 y 90 minutos; después de este tiempo la glucemia disminuyó gradualmente. Los animales que recibieron acarbosa presentaron valores de glucemia menores que los medidos en animales testigo desde los 30 minutos hasta el final del ensayo (120 minutos). Mientras que el grupo que recibió el extracto de fruto verde de *C. loniceroides*; en el estudio de la actividad de α -amilasa mostraron valores de glucemia más bajos que los del grupo de Acarbosa; desde los 30 hasta los 120 minutos (Figura 15).

Por el contrario, en el estudio antihiperoglucemiente de la α -glucosidasa el grupo de animales que recibieron el extracto de tallo de *C. loniceroides* fueron los que mostraron niveles más bajos de glucemia comparados con el grupo testigo desde los 30 hasta los 120 minutos (Figura 16). Al final del ensayo todos los grupos tratados con los diferentes extractos de *C. loniceroides* mostraron valores de hipoglucemia más bajos que el grupo control, sin embargo, solo los extractos de tallo y fruto verde presentaron respuesta similar a los grupos tratados con Acarbosa (Control +).

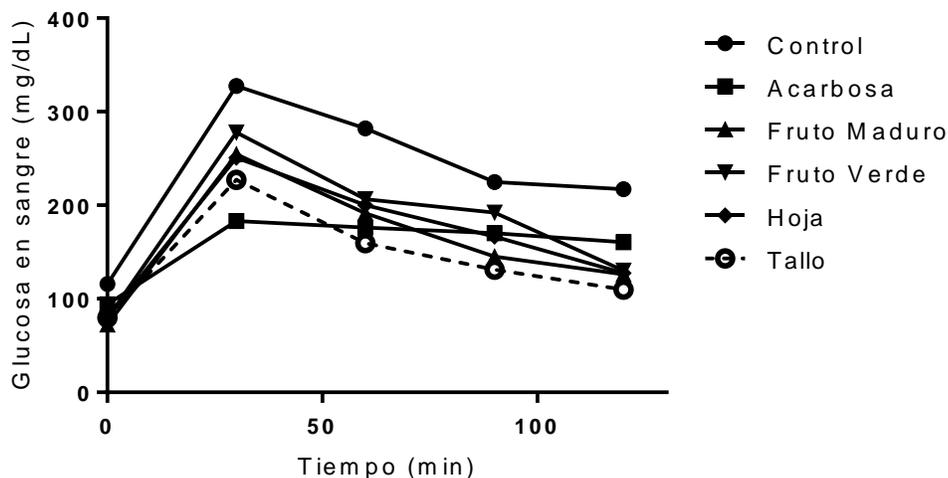


Figura 16. Evaluación de la actividad de la α -glucosidasa durante la administración de *C. loniceroides* y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.

Los datos dieron evidencia del efecto del extracto de tallo y fruto verde en la reducción de la glucosa postprandial en ratones sanos, después de la administración de sacarosa y almidón, respectivamente. Estos resultados indican que el extracto de tallo logra mayor inhibición de la

hidrolisis del almidón y el extracto de fruto verde tiene una mayor inhibición sobre la digestión de disacáridos como la sacarosa.

Por lo que estos extractos tienen la capacidad de regular el paso de la glucosa al torrente sanguíneo; mediante la inhibición de la hidrolisis de los carbohidratos. Y de esta manera podrían evitar la hiperglucemia crónica, es decir tienen un efecto antihiperglucemiante. El mismo efecto se ha encontrado en otras fuentes como el amaranto, donde se ha utilizado la fracción acuosa (AG) o una fracción oleosa (AO). Se ha visto que AG y AO tienen la capacidad para contrarrestar la hiperglucemia y además es un desencadenante esencial para que el hígado vuelva a su homeostasis normal durante la diabetes experimental (Kim *et al.*, 2006). Otra fuente también estudiada, dentro de los muérdagos es *Viscum (V.) Album*, algunos estudios sugieren que parte de la acción antihiperglucemiante del extracto de *V. album* puede estar disminuyendo la absorción de glucosa *in vivo*. Estudios adicionales con las plantas más efectivas demostraron que las actividades antihiperglucémicas se explicaron en parte por la capacidad de los componentes vegetales hidrosolubles, ya que aumentan el transporte de glucosa y el metabolismo en el músculo y/o simular la secreción de insulina. La disminución de la convección y difusión de la glucosa gastrointestinal ahora se cree que es la razón por la cual los componentes viscosos de la planta tienen propiedades antihiperglucémicas (Kim *et al.*, 2014). Investigaciones publicadas sugieren que existe una relación directa entre la capacidad de una planta para inhibir la absorción de glucosa y la viscosidad de los polisacáridos solubles de las plantas constituyentes. El extracto de *C. loniceroides* presentó una consistencia viscosa; sin embargo, no se determinó en el presente estudio. Los resultados de inhibición de los frutos de *C. loniceroides* podrían deberse en parte al mucílago presente, se sabe que los mucilagos tienen un efecto benéfico para reducir los niveles de glucosa en sangre. Los mucilagos, debido a su naturaleza polisacárida, producen un número indefinido de oligosacáridos en la hidrólisis (Juárez *et al.*, 2015). La acarbosa, también un oligosacárido, pero de origen bacteriano, capaz de inhibir la α -glucosidasa, por lo que es usada como medicamento para tratar la diabetes mellitus tipo 2. Por lo tanto, la inhibición de las enzimas intestinales como α -glucosidasa y α -amilasa podrían estar involucradas en el efecto antihiperglucemiante de los extractos de tallo y fruto verde (Chiasson *et al.*, 2003).

7.11. Transaminasas hepáticas AST y ALT

Las Figuras 17a y 17b muestran el efecto de extractos de *C. loiceroides* sobre marcadores hepáticos (ALT y AST) en ratones con diabetes inducida. Se encontró que en el grupo STZ las concentraciones de AST y ALT aumentan de manera significativa respecto al grupo NG. Los resultados obtenidos presentan una tendencia similar a lo reportado en la literatura; ya que hay un aumento en los índices de parámetros de disfunción hepática de ratas diabéticas no tratadas, como AST, ALT y ALP de 32.63%, 41.36% y 27.01%, respectivamente, es porcentaje respecto al grupo control (Ben Salem et al., 2017). Sin embargo, en este caso las enzimas marcadoras de la función hepática, AST y ALT, se mejoraron con la suplementación con *C. loniceroides*.

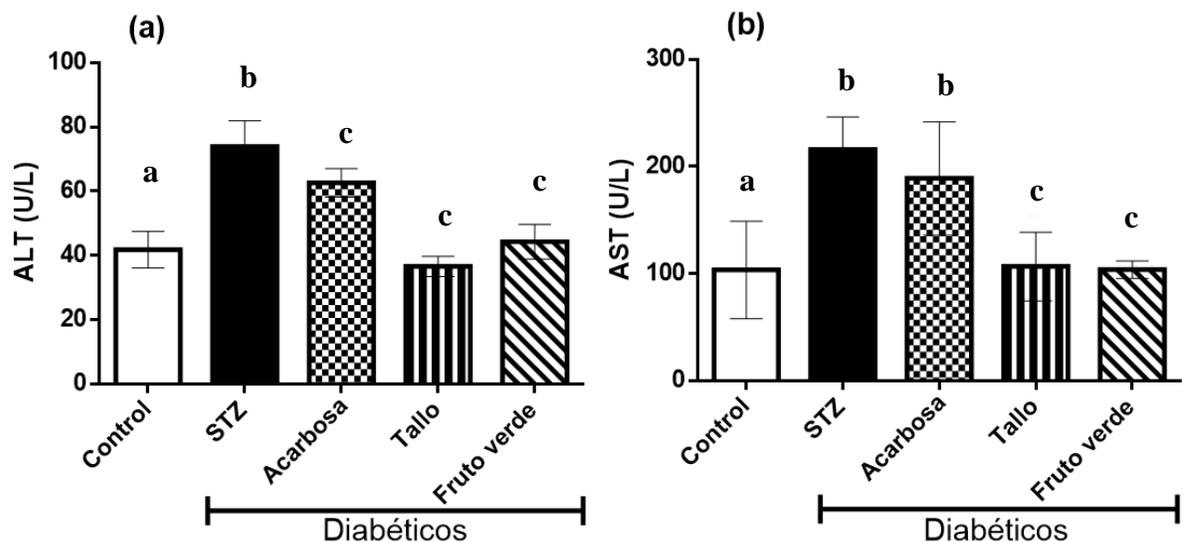


Figura 17. Evaluación de la actividad de la α -glucosidasa durante la administración de *C. loniceroides* y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.

Después del tratamiento subcrónico con EA de tallo y fruto verde; se encontró que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles de ALT de los ratones normoglicémicos y los grupos con tratamiento de *C. loniceroides*. Sin embargo, la administración de acarbosa indujo un aumento en la ALT sérica. Por otro lado, los niveles de AST en ratones diabéticos inducidos con STZ también aumentaron como consecuencia de la diabetes. Por otro lado, la administración de acarbosa, utilizada como control positivo, aumentó el nivel de AST en suero, que fue similar al de los ratones diabéticos. En contraste, la administración de EA de tallos y

frutos inmaduros durante 35 días restauró el nivel de AST a un nivel similar al de los ratones normoglucémicos ($p < 0.05$).

El aumento de las actividades de plasma AST y ALT indican que la DM puede inducir disfunción hepática. Estas enzimas están directamente asociadas con la conversión de aminoácidos a cetoácidos, y se incrementan en la condición diabética. También se ha reportado un aumento en las actividades de AST y ALT en el hígado de animales diabéticos (El-Demerdash *et al.*, 2005). Los tratamientos con *C. loniceroides* normalizaron estas actividades enzimáticas. Del mismo modo, el aumento de las actividades de AST y ALT en el hígado diabético también han sido reportadas por otras fuentes naturales (Kaleem *et al.*, 2008). El aumento del catabolismo de proteínas que acompañan la gluconeogénesis y la formación de urea que se ven en el estado diabético podría ser responsable de la elevación de estas transaminasas tisulares. El aumento en la actividad de la ALT se debe al daño hepatocelular y es usualmente acompañado por un aumento en AST (Rao *et al.*, 1989). Esto podría ser la razón de las elevadas actividades de estas enzimas, que fueron devueltas a valor casi normal por los tratamientos de *C. loniceroides* de tallo y fruto verde. Este resultado podría mostrar los efectos de normalización de *C. loniceroides* sobre el daño hepatocelular.

7.12. Efecto de los extractos de *C. loniceroides* sobre la secreción de citocinas

Los marcadores proinflamatorios séricos; IL-6 y TNF- α en ratones diabéticos se incrementaron a los de ratones normoglicémicos ($p < 0,05$) y los niveles de marcador antiinflamatorio IL-10 en ratones diabéticos se redujeron (Fig. 18a, 18b y 18c). Se encontró que al aplicar el tratamiento con los extractos de tallo y fruto verde de *C. loniceroides* y acarbosa no alteró significativamente la concentración de citocina IL-10 (Fig. 18b) en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). Por otro lado, la concentración de TNF- α disminuyó notablemente tanto con los extractos de *C. loniceroides* como con los tratamientos de acarbosa (Fig. 18C) en comparación con el grupo diabético ($p < 0.05$) y mejoró los niveles de TNF- α ; incluso a niveles cercanos a los del grupo de normoglicémico (control).

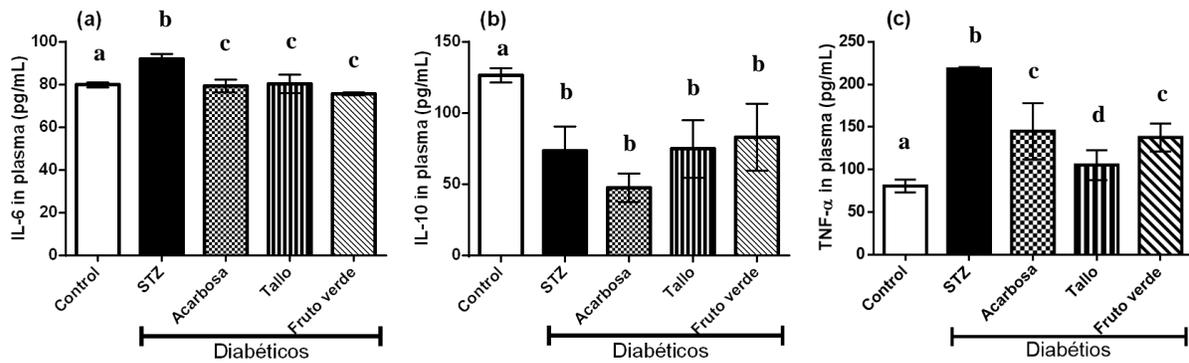


Figura 18. Evaluación de la actividad de la α -glucosidasa durante la administración de *C. loniceroides* y acarbosa durante una evaluación oral de tolerancia a la glucosa.

En DM se ha encontrado que hay una sobre producción de citocinas pro-inflamatorias (MCP-1, TNF- α , IL-6, IL-18, leptina, resistina, etc.) (Khanra et al., 2015) y la disminución de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, adiponectina, adipocinas, etc.) (M. Hossain *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos coinciden con lo anterior, en el caso del grupo de ratones diabéticos hay una baja en la concentración de IL-10, lo que favorece la producción de IL-6 y TNF- α , lo cual está relacionado con la actividad antioxidante, ya que hay una disminución de la actividad de GR y GPx; generando aumento de MDA y disminución de la proporción GSH/GSSG, indicando un aumento del estrés oxidativo a nivel celular.

Se sabe que TNF- α es un mediador inflamatorio importante, que es inducido por ROS. De manera similar, Ritu Khanra, et al. mostraron que las ratas T2D tenían un aumento en las concentraciones de citoquinas proinflamatorias. Se sabe también que TNF- α juega un papel importante en el proceso inflamatorio; estimula a los macrófagos en la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias: IL-1, IL-6 e IL-12 (Khanra *et al.*, 2015). Estas interleucinas, especialmente IL-1 e IL-6, contribuyen enormemente a la intensificación de la inflamación (Badescu *et al.*, 2015). En este estudio, la concentración de IL-6 y TNF- α en el grupo de ratones diabéticos inducidos por STZ también puede estar relacionada con el estrés oxidativo celular ya que hay una disminución en la actividad de GR y GPx, lo que promueve un aumento en MDA y una disminución en la relación GSH / GSSG.

7.13. Marcadores del estrés oxidativo

7.13.1. Efecto de *C. loniceroides* y acarbosa sobre la concentración de GSH, GSSG, GPx y GRd.

En la tabla 12, se muestran las concentraciones de GSH, GSSG, GSH/GSSG y GSH+GSSG en hígado de los diferentes grupos de estudio.

Fue evidente que el tejido hepático de los grupos con diabetes experimental y los tratados con acarbosa mostraron decremento de la concentración de GSH y aumento de GSSG. Ambos cambios con diferencias significativas ($p < 0.05$). El grupo de ratones diabéticos inducidos por STZ además mostró un aumento en los niveles de MDA, AST y GSSG. Los pacientes con DT2 suelen tener un aumento en el estrés oxidativo ya que hay un aumento en las especies ROS; debido a que sus sistemas antioxidantes disminuyen. Por otro lado, la concentración de GSH y la relación GSH/GSSG en el hígado de ratones diabéticos inducidos por STZ disminuyeron. La relación de GSH y GSSG es un indicador sensible del estrés oxidativo.

El estado diabético dio como resultado un agotamiento significativo del nivel de GSH y la relación GSH/GSSG, lo que indica que hay mayor utilización contra los ROS generados en ratones diabéticos (Oyenihi *et al.*, 2015). La relación GSH/GSSG está inversamente relacionada con el estrés oxidativo y se usa a menudo como un índice sensible del estrés oxidativo *in vivo*, tal como la ha reportado Díaz- Flores *et al.* (2012) usando el extracto acuoso de frutos de *Cucurbita ficifolia*, donde la concentración de GSSG aumenta sin cambios en GSH, pero con una relación GSH/GSSG más baja en el corazón ratones con diabetes inducida por STZ (Díaz- Flores *et al.*, 2012).

En el grupo tratado con fruto verde de *C. loniceroides* se aumentó GSH en un 60% y se redujo GSSG en un 29%; esto a su vez aumentó en un 75% la relación GSH/GSSG con respecto al grupo diabetes experimental y el tratado con acarbosa. Se sabe que una alta relación GSH/GSSG es esencial para la protección contra el estrés oxidativo.

Tabla 12. Niveles de GSH después de la administración diaria de *C. loniceroides* y acarbosa en ratones con diabetes inducida.

	Grupos	Hígado
GSH (μM)	Control	213.93 \pm 13.81 ^a
	STZ	148.93 \pm 9.98 ^c
	Acarbosa	148.21 \pm 3.51 ^c
	Tallo	152.2 \pm 5.23 ^c
	Fruto verde	244.89 \pm 14.94 ^{b,c}
GSSG (μM)	Control	74.05 \pm 10.18 ^b
	STZ	123.59 \pm 5.39 ^c
	Acarbosa	53.43 \pm 3.27 ^a
	Tallo	78.63 \pm 18.07 ^b
	Fruto verde	79.58 \pm 9.97 ^b
GSH/GSSG	Control	2.94 \pm 0.57 ^b
	STZ	1.17 \pm 0.10 ^c
	Acarbosa	2.48 \pm 0.10 ^a
	Tallo	2.25 \pm 0.53 ^a
	Fruto verde	3.08 \pm 0.66 ^a
GSH+GSSG	Control	287.97 \pm 14.14 ^c
	STZ	272.52 \pm 10.38 ^c
	Acarbosa	201.64 \pm 6.76 ^a
	Tallo	230.83 \pm 19.01 ^b
	Fruto verde	324.47 \pm 5.07 ^d

^a p<0.05 comparado con STZ.

^b p<0.05 comparado con STZ o acarbosa.

^c p<0.05 comparado con Control.

En la figura 19, se muestran los cambios de las actividades de GPx y GR en hígado. Las actividades de GPx y GR en hígado de los grupos diabetes experimental y acarbosa mostraron incrementos aproximadamente de 1.5 veces más con respecto al control.

El tratamiento con *C. loniceroides* decrece las actividades, tanto de GPx, como de GR. El decremento correspondió aproximadamente a 1.44 y 1.7 veces menos respectivamente, cuando se comparó con el grupo control con diabetes experimental. Estos resultados indican que *C. loniceroides* restaura las actividades de GPx y GR en ratones diabéticos.

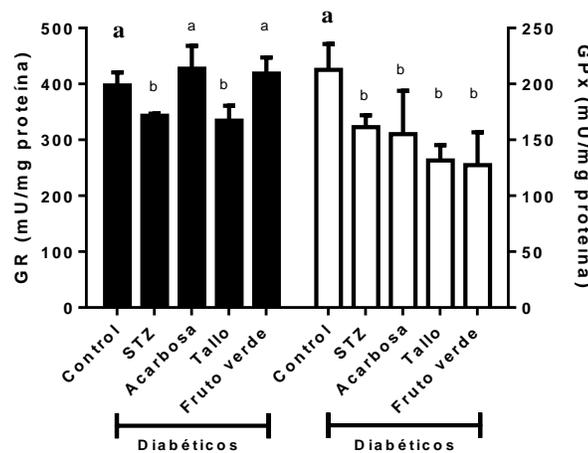


Figura 19. Actividades de GPx y GR en hígado de ratones con diabetes experimental tratados con *C. loniceroides* y acarbosa. Las barras representan la media \pm D.E: $p < 0.05$ con respecto al control.

Bajo condiciones diabéticas, también se ha detectado una disminución en la actividad de GPx y GR (Mohamadin *et al.*, 2011).

Dado que, el contenido de GSH intracelular y la relación GSH/GSSG se regulan a diferentes niveles para mantener la homeostasis celular. En este ciclo, la acción coordinada de GPx y GR conduce a la reducción de hidroperóxidos a expensas de la oxidación de GSH y, posteriormente, el GSSG es reciclado por GR. En condiciones de hiperglucemia, la síntesis de GSH y el metabolismo se encuentran alterados, lo que contribuye a la susceptibilidad del daño oxidativo. Se ha observado una disminución en el nivel de GSH y GPx, lo que podría conducir a una baja relación GSH/GSSG en ratas diabéticas (Oyenihi *et al.*, 2015). La disminución en el nivel de GSH también representa una mayor utilización debido al estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2006).

7.13.2. Peroxidación lipídica

Después de aplicar el tratamiento subcrónico diario durante cinco semanas, de EA de tallo y fruto verde de *C. loniceroides*, se observó lipoperoxidación en el hígado a través de la producción de MDA (Fig. 20), el cual es un marcador de daño oxidativo. Los resultados muestran que la concentración de MDA aumentó 1,65 veces en el grupo de STZ en comparación con el control. En los grupos tratados con *C. loniceroides* y acarbosa, las concentraciones de

MDA disminuyen; en el grupo de tallo 1.5 veces y 1.76 veces para el fruto verde, mientras que en el grupo de la acarbosa no hubo diferencia en comparación con el grupo STZ.

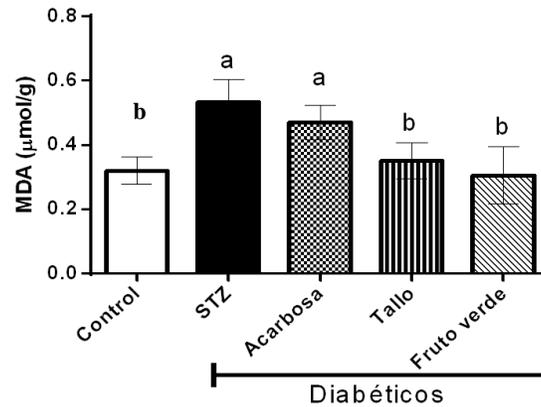


Figura 20. Determinación de la concentración de MDA, después de una dosificación diaria durante cinco semanas de EA de *C. loniceroides*, evaluada en el hígado de ratones diabéticos inducidos con STZ.

Los valores obtenidos en los grupos de *C. loniceroides* fueron similares a los de los animales no diabéticos. Estos hallazgos sugieren que los extractos tienen efecto protector contra la lipoperoxidación producida por diabetes.

En cuanto a la diabetes, se sabe que hay una mayor incidencia de MDA debido a la lipoperoxidación (Fatani *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2014), que provoca un aumento de los radicales libres, así como mayores concentraciones de MDA en hígado. Esta condición clínica también se observó en ratas diabéticas inducidas por STZ (Díaz *et al.*, 2012; Fortis *et al.*, 2013). Los niveles elevados de oxidantes tóxicos en animales diabéticos se deben a procesos como la oxidación de la glucosa y la peroxidación de lípidos (Kim *et al.*, 2006). En este estudio, los EA de *C. loniceroides* lograron restablecer el estado redox normal en el hígado porque cuando se administraron los EA de muérdago, los niveles de MDA fueron similares a los del grupo control de ratones normoglucémicos.

8. Conclusiones

La ebullición de hoja, tallo y fruto verde y maduro de *C. loniceroides* fue un método más eficiente para la extracción de polifenoles en comparación al método de maceración. Los extractos de hoja y tallo mostraron mayor concentración de polifenoles totales, y flavonoides, así como mayor actividad antioxidante, evaluada por diferentes métodos, en comparación a los extractos crudos de fruto verde y maduro. Solo en el caso de los extractos de fruto verde y maduro la cantidad de taninos fue mayor que en hoja y tallo. Todos los extractos de hoja y tallo, por ebullición y maceración, también mostraron una actividad inhibitoria de la α -glucosidasa superior a la que mostraron los extractos de fruto verde y maduro. Sin embargo, solo los extractos crudos de fruto verde y maduro tuvieron actividad inhibitoria de α -amilasa. En vista de que, hasta la fecha, no ha habido reporte sobre estudios de inhibición de enzimas digestivas y su relación con la actividad antioxidante de *C. loniceroides*; estos resultados podrían ser una importante contribución al estudio de la actividad biológica de esta planta y su posible papel antihiper glucémico en sujetos con hiperglucemia.

El análisis realizado en el presente estudio puede ser una evidencia de que el extracto acuoso de fruto verde de *C. loniceroides* puede tener una actividad antidiabética significativa y también pueden aliviar algunas complicaciones diabéticas debido al estrés oxidativo. Este muérdago puede inhibir no solo las enzimas que hidrolizan carbohidratos, sino que también puede disminuir el estrés oxidativo. También puede disminuir los marcadores séricos proinflamatorios como IL-6 y TNF- γ , por último, puede restablecer el nivel de transaminasas hepáticas. Sin embargo, aún no se han realizado más investigaciones para confirmar y evaluar estos efectos tanto a nivel *in vitro* como clínico.

9. Recomendaciones

Para un mejor conocimiento de la actividad antidiabética del extracto acuoso del fruto verde de muérdago *Cladocolea loniceroides*, se sugieren los siguientes estudios.

- Purificar y caracterizar el compuesto o compuestos que confiere la actividad inhibitoria de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.
- Evaluar el efecto del o de los compuestos identificados; a diferentes concentraciones, sobre la actividad antihiper glucemiante e hipoglucemiente.
- Realizar la evaluación del efecto citotóxico en células pancreáticas y hepáticas.

10. Apéndices

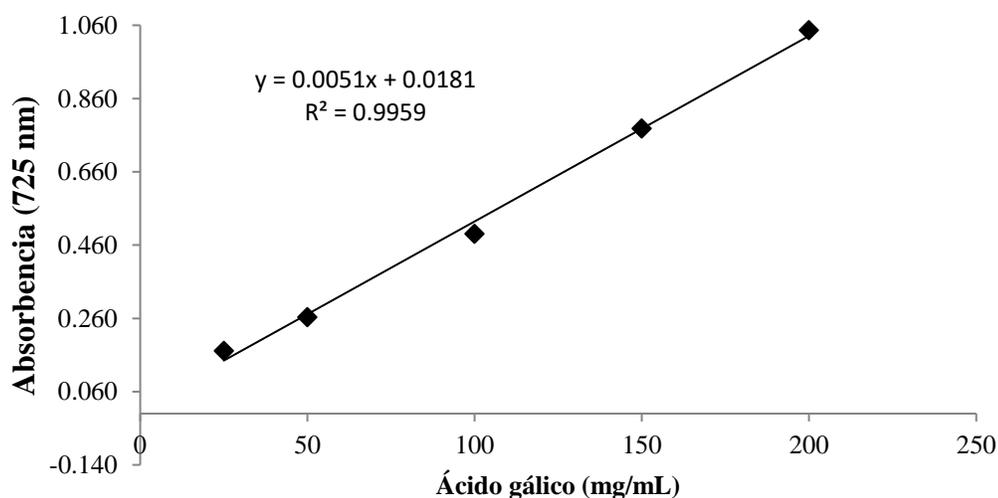
Apéndice A

Curva estándar en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

En la tabla A se muestran las concentraciones de ácido gálico utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de polifenoles totales en los extractos de muérdago. Así mismo, en la gráfica A, se muestra la curva de ácido gálico (mg/L) versus absorbencia a 725nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de polifenoles en equivalentes de ácido gálico.

Tabla A. Curva estándar de ácido gálico para cuantificación de polifenoles totales

Ácido gálico (mg/mL)	Absorbencia (725 nm)
25	0.171 ±0.0372
50	0.263 ±0.0119
100	0.491 ±0.0168
150	0.777 ±0.0111
200	1.046 ±0.0246



Gráfica A. Curva estándar de Ácido gálico para la cuantificación de polifenoles

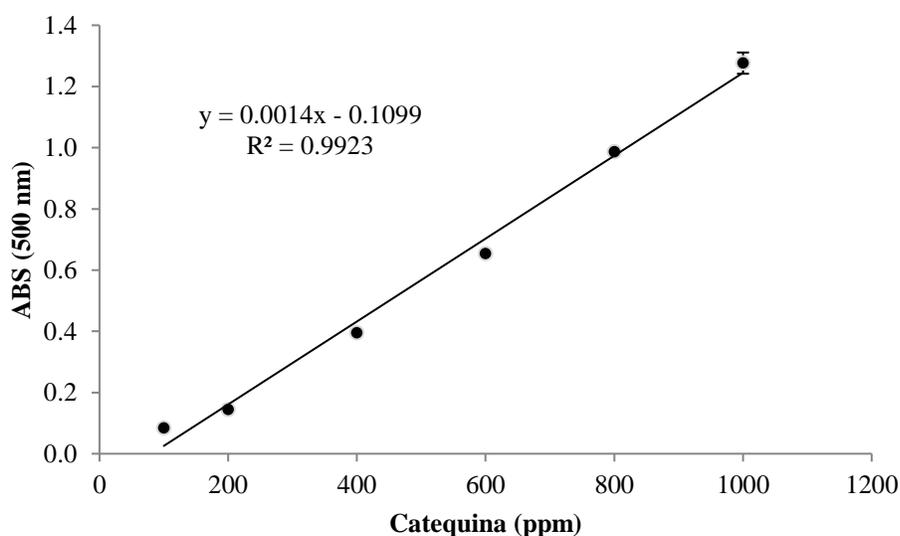
Apéndice B

Curva estándar en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de taninos condensados.

En la tabla B se muestran las concentraciones de catequina utilizadas para la elaboración de la curva estándar para la determinación de taninos condensados en los extractos de fruto de muérdago. Asimismo, en la figura B, se muestra la curva de catequina (mg/L) versus absorbancia a 500 nm, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta para la determinación de taninos condensados.

Tabla B. Concentración de catequina y absorbancia a 500 nm.

Catequina (ppm)	Absorbancia (500 nm)
100	0.08 ±0.0040
200	0.145 ±0.0007
400	0.395 ±0.0000
600	0.654 ±0.0078
800	0.986 ±0.0049
1000	1.0276 ±0.0346



Gráfica B. Curva estándar de catequina para la determinación de taninos condensados.

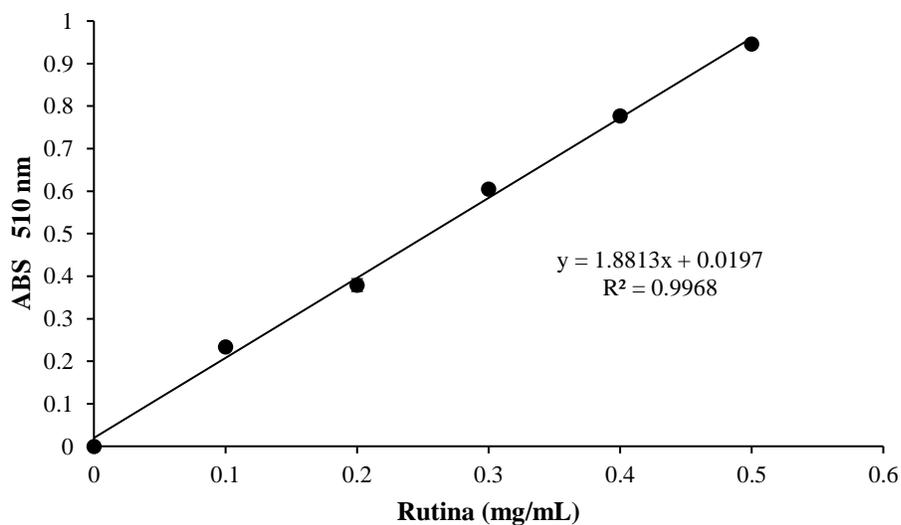
Apéndice C

Curva estándar en equivalentes de ácido gálico para la cuantificación de cuantificación de flavonoides

La curva estándar se muestra en la tabla C y la gráfica y ecuación de la recta obtenida, en la Gráfica C.

Tabla C. Curva estándar de rutina para cuantificación de flavonoides

Rutina (mg/mL)	Absorbencia (510 nm)
0	0
0.1	0.234 ±0.0067
0.2	0.379 ±0.0147
0.3	0.604 ±0.0025
0.4	0.776 ±0.0064
0.5	0.946 ±0.0053

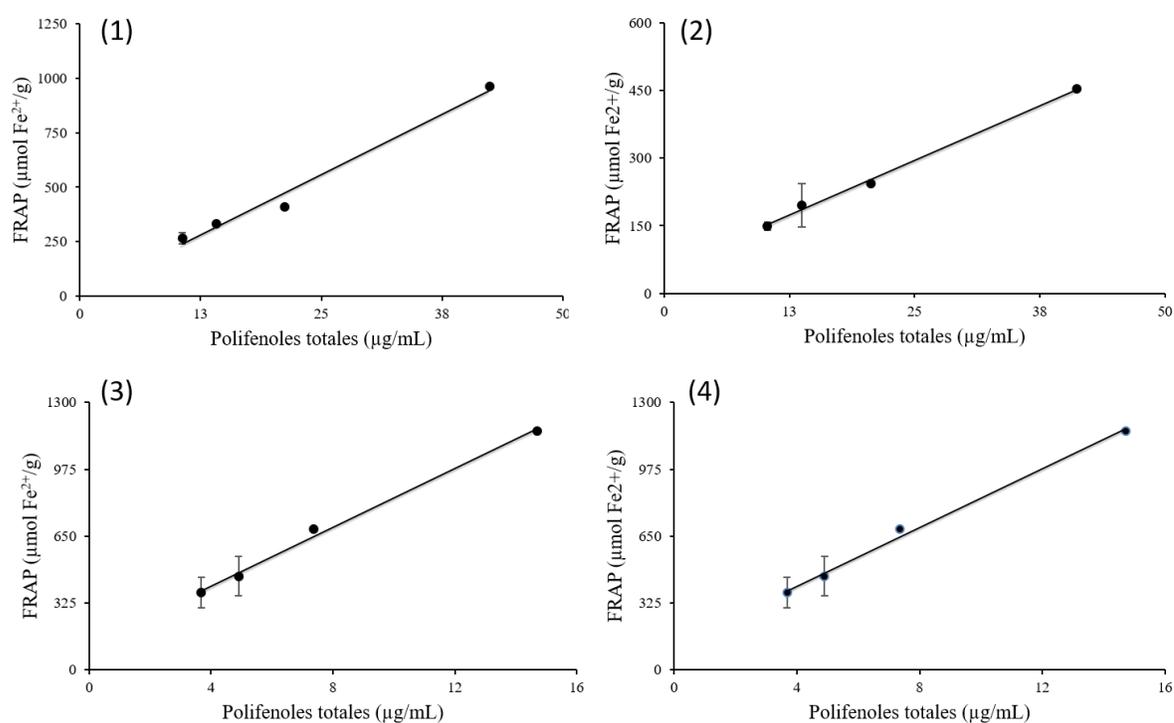


Gráfica C. Curva estándar de rutina para la evaluación de flavonoides

Apéndice D

Poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)

Relación entre el poder antioxidante y la cantidad de polifenoles de los extractos de muérdago



Gráfica D. Valores de FRAP y contenido total de polifenoles en extractos de muérdago. Los resultados muestran una fuerte correlación entre los dos parámetros (1) Fruto verde ($r=0.990$, $p<0.0001$), (2) Fruto maduro ($r=0.998$, $p<0.0001$), (3) Hoja ($r=0.997$, $p<0.0001$) y (4) Tallo ($r=0.994$, $p<0.0001$).

Apéndice E

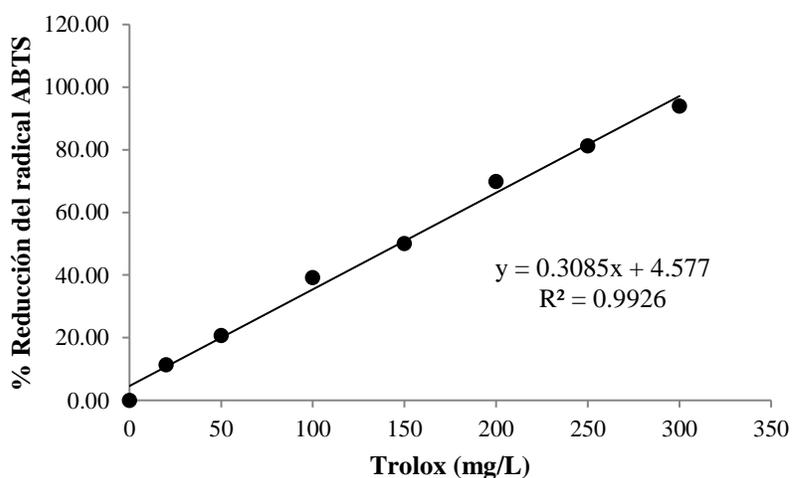
Curva estándar en equivalentes de Trolox para la evaluación de la inhibición del radical ABTS

En la Tabla E se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para obtener el % de Reducción del radical ABTS por las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica E se muestra la curva de Trolox (mg/L) versus % Reducción del radical ABTS (absorbencia a 725 nm) y su respectiva ecuación, para la determinación de polifenoles en equivalentes de Trolox.

Tabla E. Curva estándar de Trolox para cuantificación de polifenoles totales

Trolox (mg/L)	% Reducción del radical ABTS
20	11.42
50	20.78
100	39.22
150	50.13
200	69.91
250	81.27
300	94.01



Gráfica E. Curva estándar de Trolox para evaluación de reducción de radical ABTS.

Apéndice F

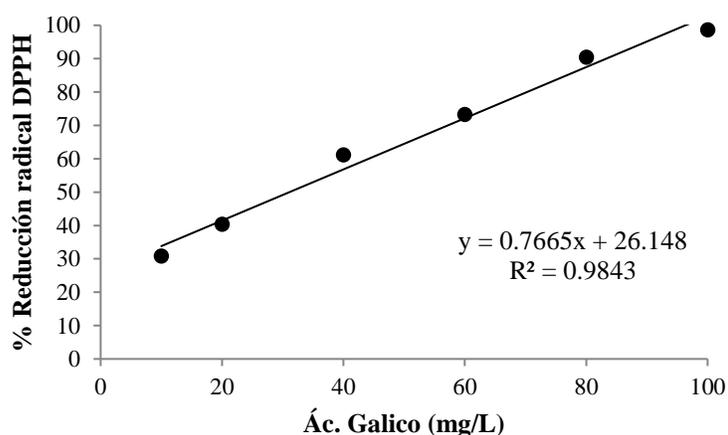
Curva estándar en equivalentes de Ácido gálico para la evaluación de la inhibición del radical DPPH•

En la Tabla F se muestra las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva estándar, que sirvió de referencia para la evaluación de la reducción del radical DPPH• de las muestras analizadas en el presente estudio.

En la gráfica F se muestra la curva en equivalentes de ácido gálico (mg/L) versus % de inhibición del radical DPPH• a 517 nm y su respectiva ecuación obtenida de su correspondiente linealización, para la evaluación de la capacidad antioxidante en mg equivalentes de ácido gálico.

Tabla F. Curva estándar de ácido gálico para la evaluación de equivalentes de reducción de DPPH•

Ác. Galico mg/L	% Reducción
10	30.76
20	40.37
40	61.15
60	73.23
80	90.41
100	98.57



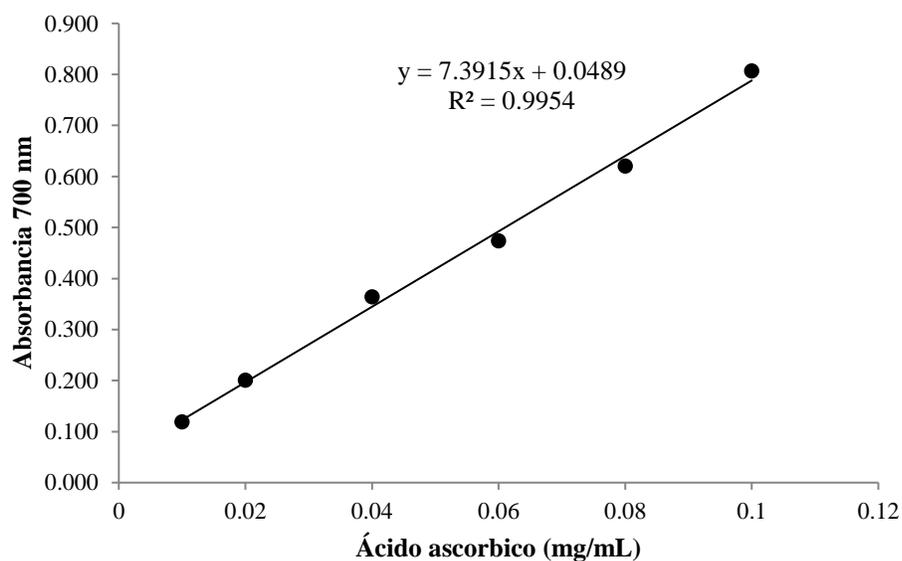
Gráfica F. Curva estándar de ácido gálico para la evaluación de reducción de radical DPPH•

Apéndice G

Curva estándar de ácido ascórbico para la evaluación del poder reductor

Tabla G. Curva estándar de ácido ascórbico sobre el poder reductor

Ácido ascórbico (mg/mL)	Absorbencia (700 nm)
0.01	0.119
0.02	0.201
0.04	0.364
0.06	0.474
0.08	0.620
0.1	0.807

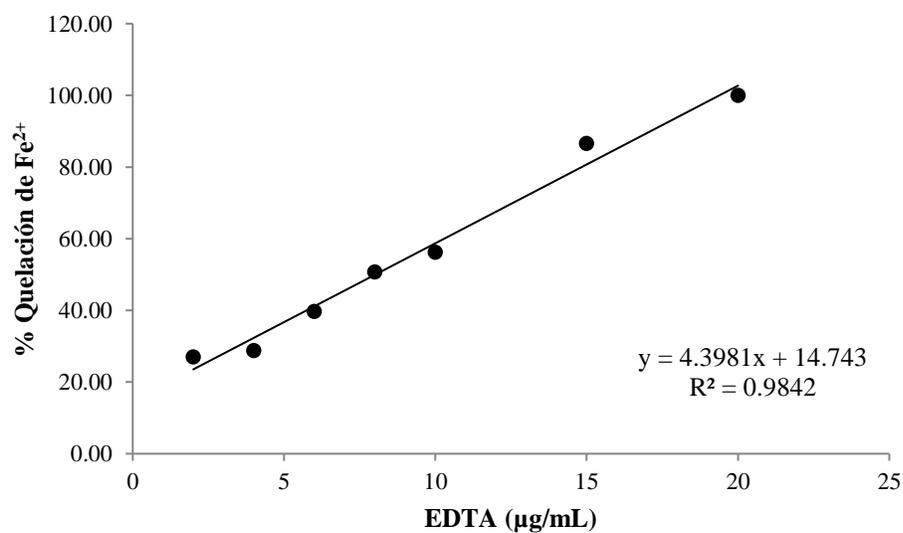


Gráfica G. Curva estándar de ácido ascórbico para la comparación del poder reductor con los extractos de muérdago.

Apéndice H

Curva estándar para la determinación de la actividad quelante de Fe^{2+} Tabla H. Curva estándar para la determinación de actividad quelante de Fe^{2+}

EDTA ($\mu\text{g/mL}$)	% Quelación
2	27 ± 0.37
4	28.79 ± 2.45
6	39.71 ± 2.12
8	50.73 ± 0.35
10	56.26 ± 1.80
15	86.59 ± 1.76
20	100 ± 0.00

Gráfica H. Curva estándar de EDTA para la comparación de la actividad quelante de Fe^{2+} de los extractos de muérdago.

Apéndice I

Productividad

LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS SE HAN PRESENTADO EN LOS SIGUIENTES FOROS ESPECIALIZADOS:

Primer lugar en presentación oral, en el 2° CONGRESO DE BIOTECNOLOGÍA DIVERSA. Del 18 al 20 de octubre de 2017, en la Ciudad de Puebla, Puebla. Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla (UPMP) y la Universidad Politécnica de Puebla (UPPue).

Presentación Oral: En la XI Semana de la Biotecnología. Del 04 al 08 de Septiembre de 2017. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Presentación Cartel: En la 13ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Del 17 al 20 de Mayo de 2017, en Morelia, Michoacán, México.

Presentación Oral: En el V Congreso Internacional de Avances de las Mujeres en las ciencias. Del 28 al 30 de Septiembre de 2016. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco.

Presentación poster: En el International Congress Bio.Iberoamerica 2016: Biotecnología Integrando Continentes. Del 5-8 de Junio de 2016, en Salamanca, España.

Presentación poster: En el XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Del 3 al 6 de mayo de 2016, Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Presentación poster: En el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México. Del 21-26 de junio de 2015. En Guadalajara Jalisco.

PUBLICACIONES

Ruiz, F. M. H. P., Barrera, A. F., Alquicira, E. P., Pérez, J. C. A., Ramos, R. R., & Santos, J. S. (2019). Antihyperglycemic, antioxidant and anti-inflammatory effects of aqueous extract of mistletoe (*Cladocolea loniceroides*) in STZ-induced diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 16(1), 1-12.

Paredes-Ruiz, F.M.H, Soriano-Santos, J. (2023). Review Of Mistletoes - A Resource in Diabetes. *Journal of Engineering Research*, 3(29), 1-14.

11. Bibliografía

- Abesundara, K. J., Matsui, T., & Matsumoto, K. (2004). α -Glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2541-2545.
- AbouL-Enein, A. M., El-Baz, F. K., El-Baroty, G., Youssef, A., & Abd El-Baky, H. H. (2003). Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation. *J. Med. Sci*, 3(1), 87-98.
- Aguilar, A., & Xolalpa, S. (2002). La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia*, 53(3), 24-35.
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. f. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), 539-553.
- Alejandro-Espinosa, M., Jaramillo-Fierro, X., Ojeda-Riascos, S., Malagón-Aviles, O., & Ramírez-Robles, J. (2013). Actividad antioxidante y antihiperglucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(1).
- Alvarado-Rosales, D., & Saavedra-Romero, L. d. L. (2005). El género *Cladocolea* (Loranthaceae) en México: Muérdago verdadero o injerto. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 11(1), 5-9.
- Amarowicz, R. (2007). Tannins: the new natural antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 549-551.
- Ameri, A., Heydarirad, G., Mahdavi Jafari, J., Ghobadi, A., Rezaeizadeh, H., & Choopani, R. (2015). Medicinal plants contain mucilage used in traditional Persian medicine (TPM). *Pharmaceutical biology*, 53(4), 615-623.
- Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F. V., Estrela, J. M., & Viña, J. (1994). [35] Determination of oxidized glutathione in blood: High-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology*, 234, 367-371.
- Aslan, M., Orhan, N., Orhan, D. D., & Ergun, F. (2010). Hypoglycemic activity and antioxidant potential of some medicinal plants traditionally used in Turkey for diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 128(2), 384-389.

- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*(494), 161-172.
- Badescu, M., Badulescu, O., Badescu, L., & Ciocoiu, M. (2015). Effects of *Sambucus nigra* and *Aronia melanocarpa* extracts on immune system disorders within diabetes mellitus. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 533-539.
- Barrett, A., Ndou, T., Hughey, C. A., Straut, C., Howell, A., Dai, Z., & Kaletunc, G. (2013). Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), 1477-1486.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Birkenfeld, A. L., & Shulman, G. I. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology*, 59(2), 713-723.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *diabetes*, 54(6), 1615-1625.
- Cai, Y., Zhang, J., Chen, N. G., Shi, Z., Qiu, J., He, C., & Chen, M. (2017). Recent advances in anticancer activities and drug delivery systems of tannins. *Medicinal research reviews*, 37(4), 665-701.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., . . . Sanada, C. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition journal*, 9(1), 3.
- Carvajal-Sandoval, G., Zamudio-Cortes, P., Carvajal-Juarez, M., & Juarez-de Carvajal, E. (2007). V. Prevención de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia. *Gac. Med. Mex*, 143, 51-59.
- Casanueva Álvarez, E. (2016). La influencia del selenio en la detoxificación de radicales libres.

- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212.
- Chavan, J., Kadam, S., Ghonsikar, C., & Salunkhe, D. (1979). Removal of tannins and improvement of in vitro protein digestibility of sorghum seeds by soaking in alkali. *Journal of Food Science*, 44(5), 1319-1322.
- Chew, Y. L., Chan, E. W. L., Tan, P. L., Lim, Y. Y., Stanslas, J., & Goh, J. K. (2011). Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 12.
- Chiasson, J.-L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., & Group, S.-N. T. R. (2003). Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *Jama*, 290(4), 486-494.
- Cho, J.-S., Kim, J.-Y., Kim, I.-H., & Kim, D.-I. (2003). Effect of polysaccharide elicitors on the production of decursinol angelate in *Agelica gigas* Nakai root cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(2), 158.
- Cisneros E. La glutatión reductasa y su im-12. portancia biomédica. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 1995;14(1):0-0.
- Cisneros E, Pupo J, Céspedes E. Enzimas que13. participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 1997;16(1):10-5.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H., & Vlietinck, A. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 445-459.
- Díaz-Flores, M., Angeles-Mejia, S., Baiza-Gutman, L., Medina-Navarro, R., Hernández-Saavedra, D., Ortega-Camarillo, C., . . . Alarcon-Aguilar, F. (2012). Effect of an aqueous

- extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 144(1), 101-108.
- Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G., . . . Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1), 237-246.
- Dyer, R., Stewart, M., Mitcheson, J., Geoge, K., Alberti, M., & Laber, M. (1997). Malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin Chim Acta*, 260, 1-13.
- Eikenaar, C., Jönsson, J., Fritzsich, A., Wang, H.-L., & Isaksson, C. (2016). Migratory refueling affects non-enzymatic antioxidant capacity, but does not increase lipid peroxidation. *Physiology & behavior*, 158, 26-32.
- El-Demerdash, F., Yousef, M., & El-Naga, N. A. (2005). Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 57-63.
- Elmarakby, A. A., & Sullivan, J. C. (2012). Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular therapeutics*, 30(1), 49-59.
- Fatani, A. J., Al-Rejaie, S. S., Abuohashish, H. M., Al-Assaf, A., Parmar, M. Y., & Ahmed, M. M. (2015). Lutein Dietary Supplementation Attenuates Streptozotocin-induced testicular damage and oxidative stress in diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 204.
- Ferrer, J. V., Gascó, E., Sastre, J., Pallardó, F. V., Asensi, M., & Viña, J. (1990). Age-related changes in glutathione synthesis in the eye lens. *Biochemical Journal*, 269(2), 531-534.
- Fortis-Barrera, Á., Alarcón-Aguilar, F. J., Banderas-Dorantes, T., Díaz-Flores, M., Román-Ramos, R., Cruz, M., & García-Macedo, R. (2013). *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(10), 1563-1576.
- Golbidi, S., Alireza Ebadi, S., & Laher, I. (2011). Antioxidants in the treatment of diabetes. *Current diabetes reviews*, 7(2), 106-125.

- Goldstein, J. L., & Swain, T. (1963). Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, 2(4), 371-383.
- Gonçalves, R., Mateus, N., & De Freitas, V. (2011). Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. *Food chemistry*, 125(2), 665-672.
- González Montero, C., Manso Platero, F., & López Alba, A. (2014). Antidiabéticos orales y odontología. *Avances en Odontoestomatología*, 30(5), 271-281.
- Grussu, D., Stewart, D., & McDougall, G. J. (2011). Berry polyphenols inhibit α -amylase in vitro: identifying active components in rowanberry and raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2324-2331.
- Gyamfi, M. A., & Aniya, Y. (2002). Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea. *Biochemical Pharmacology*, 63(9), 1725-1737.
- Hajian, S., Asgary, S., Rafieian-Kopaei, M., Sahebkar, A., Goli-Malekabady, N., & Rashidi, B. (2016). Hibiscus esculentus seed and mucilage beneficial effects in reducing complications of diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Annals of Research in Antioxidants*, 1(2).
- Harborne, A. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*: springer science & business media.
- Hernandez-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaria, L., Roman-Ramos, R., Chavez-Miranda, A., Garcia-Vega, L., . . . Alarcon-Aguilar, F. (2002). *Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants*. Paper presented at the Proceedings of the Western Pharmacology Society.
- Hernández, F., & Hernández, F. (1959). *Historia natural de nueva España*. Retrieved from
- Hossain, M., Faruque, M. O., Kabir, G., Hassan, N., Sikdar, D., Nahar, Q., & Ali, L. (2010). Association of serum TNF- α and IL-6 with insulin secretion and insulin resistance in IFG and IGT subjects in a Bangladeshi population. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2(3), 165-168.
- Hossain, M. A., Shah, M. D., Gnanaraj, C., & Iqbal, M. (2011). *In vitro* total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts

- from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(9), 717-721.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Ikarashi, N., Toda, T., Okaniwa, T., Ito, K., Ochiai, W., & Sugiyama, K. (2011). Anti-obesity and anti-diabetic effects of acacia polyphenol in obese diabetic KKAY mice fed high-fat diet. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Isaza, M., & Hipólito, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 13(33).
- Izquierdo, A. C., Lang, C. G. R., Jiménez, C. A. C., Jiménez, M. S. C., Liera, J. E. G., Denis, B. E. R., & Salinas, K. A. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática/oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1.
- Jaiswal, N., Srivastava, S., Bhatia, V., Mishra, A., & Sonkar, A. (2012). Inhibition of Alpha-Glucosidase by *Acacia nilotica* Prevents Hyperglycemia along with Improvement of Diabetic Complications via Aldose Reductase Inhibition. *J Diabetes Metab S*, 6, 2.
- Jiménez Navarrete, M. F. (2000). Diabetes mellitus: actualización. *Acta Médica Costarricense*, 42, 53-65.
- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O. N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of ethnopharmacology*, 161, 36-45.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandl, S., & Bauer, F. (2006). The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat science*, 72(3), 446-456.
- Kaleem, M., Medha, P., Ahmed, Q., Asif, M., & Bano, B. (2008). Beneficial effects of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore medical journal*, 49(10), 800.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Zajác, Á., & Batta, G. (2004). Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(4), 1265-1271.
- Khanra, R., Dewanjee, S., Dua, T. K., Sahu, R., Gangopadhyay, M., De Feo, V., & Zia-Ul-Haq, M. (2015). *Abroma augusta* L.(Malvaceae) leaf extract attenuates diabetes induced

- nephropathy and cardiomyopathy via inhibition of oxidative stress and inflammatory response. *Journal of translational medicine*, 13(1), 6.
- Khattab, R., Goldberg, E., Lin, L., & Thiyam, U. (2010). Quantitative analysis and free-radical-scavenging activity of chlorophyll, phytic acid, and condensed tannins in canola. *Food chemistry*, 122(4), 1266-1272.
- Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S., & Kosugi, H. (1992). Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Analytical biochemistry*, 202(2), 249-255.
- Kim, H. K., Kim, M. J., Cho, H. Y., Kim, E. K., & Shin, D. H. (2006). Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell biochemistry and function*, 24(3), 195-199.
- Kim, K.-W., Yang, S.-H., & Kim, J.-B. (2014). Protein Fractions from Korean Mistletoe (*Viscum Album coloratum*) Extract Induce Insulin Secretion from Pancreatic Beta Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 8. doi:10.1155/2014/703624
- King, H., Aubert, R. E., & Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care*, 21(9), 1414-1431.
- Kumar, V., Anwar, F., Ahmed, D., Verma, A., Ahmed, A., Damanhoury, Z. A., . . . Mujeeb, M. (2014). *Paederia foetida* Linn. leaf extract: an antihyperlipidemic, antihyperglycaemic and antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 76.
- Kunyanga, C. N., Imungi, J. K., Okoth, M., Momanyi, C., Biesalski, H. K., & Vadivel, V. (2011). Antioxidant and antidiabetic properties of condensed tannins in acetonic extract of selected raw and processed indigenous food ingredients from Kenya. *Journal of Food Science*, 76(4).
- Laakso, M., & Kuusisto, J. (2014). Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(5), 293.
- Links, M. R., Taylor, J., Kruger, M. C., Naidoo, V., & Taylor, J. R. (2016). Kafirin microparticle encapsulated sorghum condensed tannins exhibit potential as an anti-hyperglycaemic agent in a small animal model. *Journal of Functional Foods*, 20, 394-399.

- Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., & Chou, C. J. (2008). Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. *Journal of medicinal chemistry*, *51*(12), 3555-3561.
- Llacuna, L., & Mach, N. (2012). Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, *16*(1), 16-24.
- Marzouk, M. S., Moharram, F. A., Mohamed, M. A., Gamal-Eldeen, A. M., & Aboutabl, E. A. (2007). Anticancer and antioxidant tannins from *Pimenta dioica* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *62*(7-8), 526-536.
- Mates, J. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, *153*(1), 83-104.
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, *3*(11), e442.
- McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(7), 2760-2766.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, *84*(4), 407-412.
- Mohamadin, A. M., Elberry, A. A., Elkablawy, M. A., Gawad, H. S. A., & Al-Abbasi, F. A. (2011). Montelukast, a leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. *Pathophysiology*, *18*(3), 235-242.
- Molina, R., & Rodríguez, C. (2012). Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, *10*(1), 7-12.
- Mukhopadhyay, A. K. (2006). *Antioxidants-natural and Synthetic*: Amani Int'l Publishers.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(4), 477-503.
- Nain, P., Saini, V., Sharma, S., & Nain, J. (2012). Antidiabetic and antioxidant potential of *Emblca officinalis* Gaertn. leaves extract in streptozotocin-induced type-2 diabetes mellitus (T2DM) rats. *Journal of ethnopharmacology*, *142*(1), 65-71.

- Nna, V., Oka, V., Aluko, E., & Helen, O. T. (2013). Comparative Effects of Aqueous Leaf Extract of *Viscum album* (Mistletoe) and *Aloe vera* gel in the Management of Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *International Journal of Diabetes Research*, 2(5), 84-89.
- O' Coinceanainn, M., Astill, C. & Baderschneider, B. (2003). Coordination of aluminum with purpurogallin and theaflavin digallate. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 96: 463-468.
- Olaiz-Fernández, G., Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. A., Rauda, J., & Villalpando, S. (2007). Diabetes mellitus en adultos mexicanos: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud pública de México*, 49, s331-s337.
- Oliveira, C. M. B. d., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Cytokines and pain. *Revista brasileira de anestesiologia*, 61(2), 260-265.
- Organization, W. H. (2013). Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy.
- Organization, W. H. (2016). *Global report on diabetes*: World Health Organization.
- Oyenihi, O. R., Brooks, N. L., & Oguntibeju, O. O. (2015). Effects of kolaviron on hepatic oxidative stress in streptozotocin induced diabetes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 236.
- Paganga, G., Al-Hashim, H., Khodr, H., Scott, B., Aruoma, O., Hider, R., . . . Rice-Evans, C. (1996). Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Report*, 2(6), 359-364.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., & Randeria, N. P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1685-1699.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214-1218. doi:10.1021/jf60219a031
- Rao, G., Morghom, L., Kabur, M., Ben, B. M., & Ashibani, K. (1989). Serum glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels in diabetes mellitus. *Indian journal of medical sciences*, 43(5), 118-121.

- Riedl, K. M., Carando, S., Alessio, H. M., McCarthy, M., & Hagerman, A. E. (2002). Antioxidant activity of tannins and tannin-protein complexes: assessment in vitro and in vivo: ACS Publications.
- Rivera, J., Shamah, T., Villalpando, S., González-Cossío, T., Hernández, B., & Sepúlveda, J. (1999). Capítulo V Preescolares. *Encuesta Nacional de Nutrición*.
- Román, R. R., Lara, L. A., Alarcón, A. F., & Flores, S. J. (1992). Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Archives of medical research*, 23(3), 105-109.
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., & Shene, C. (2011). Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): sources of antioxidant compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1630-1637.
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141-183.
- Sanés, A. (2005). Plantas medicinales.
- Serrano-Maldonado, M., Guerrero-Legarreta, I., Pérez-Olvera, C., & Soriano-Santos, J. (2011). Actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae). *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 161-170.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. M., & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2).
- Sevilla-Asencio, O. A., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L. M., & López-Martínez, L. X. (2013). Actividad inhibitoria sobre α -glucosidasa y α -amilasa de extractos acuosos de algunas especias utilizados en la cocina mexicana. *CienciaUAT*, 8(1).
- Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie*, 98(12), 1061-1075.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178): Elsevier.

- Tan, Y., Chang, S. K., & Zhang, Y. (2017). Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food chemistry*, 214, 259-268.
- Teitze, F. (1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 27(3), 502-522.
- Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- Van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-biological interactions*, 129(1), 61-76.
- Vázquez-Flores, A. A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A., & De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2), 84-93.
- Viña, J., Sastre, J., Antón, V., & Asensi, M. (1992). Efecto del envejecimiento sobre el metabolismo y las funciones del glutati6n (GSH). *GSHSystem. Glutati6n: Eje de la defensa antioxidante. Amsterdam. Excerpta Medica*, 65-78.
- Viña, J., Sastre, J., Asensi, M., & Packer, L. (1995). [21] Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise. *Methods in enzymology*, 251, 237-243.
- Wrangham, R. W., & Waterman, P. G. (1983). Condensed Tannins in Fruits Eaten by Chimpanzees. *Biotropica*, 15(3), 217-222. doi:10.2307/2387832
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489-492.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food chemistry*, 111(2), 370-376.
- Yen, G.-C., & Chen, H.-Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 27-32.
- Zajacz, Z., Halter, W. E., Pettke, T., & Guillong, M. (2008). Determination of fluid/melt partition coefficients by LA-ICPMS analysis of co-existing fluid and silicate melt

inclusions: Controls on element partitioning. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(8), 2169-2197.

Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1), 17-26.

Zimmet, P., Alberti, K., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782.

Zorrilla García, A. E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 178-185.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00280

Matrícula: 2133805859

Correlación de la actividad antioxidante de extractos de muérdago (*Cladocolea loniceroides*) sobre la glucemia y estrés oxidativo en ratones con diabetes inducida.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 23 del mes de octubre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

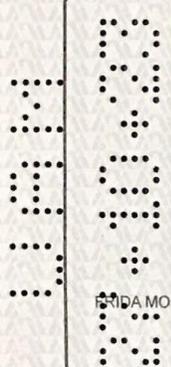
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: FRIDA MONSERRAT HOSANNA PAREDES RUIZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.





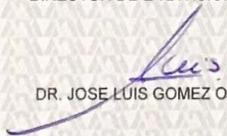
FRIDA MONSERRAT HOSANNA PAREDES RUIZ
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALÍA FERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



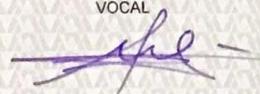
DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



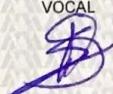
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

VOCAL



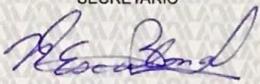
DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

VOCAL



DR. SERGIO HUERTA OCHOA

SECRETARIO



DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDÍA