



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

Área temática: Bioquímica y Fisiología

TESIS

**"Actividad antioxidante y antiinflamatoria del
extracto de acetato de etilo de inflorescencias de
Eryngium carlinae en hígado de ratas con diabetes
experimental"**

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Que presenta:
LBT. Cristian Mitchell Trejo Hurtado

Director de tesis:
D.C. Alfredo Saavedra Molina

Morelia, Michoacán, noviembre 2021

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. Diabetes mellitus	10
1.1. Clasificación de la Diabetes mellitus	10
1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1	10
1.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 2	11
1.1.1.2. Diabetes mellitus gestacional	11
1.1.1.3. Diabetes mellitus farmacológica o experimental	11
1.1.1.4. Epidemiología	12
1.1.2. Factores de riesgo	12
1.1.3. Estrés oxidante	13
1.1.3.1. Estrés oxidante e hiperglucemia	14
1.1.4. Complicaciones de la diabetes mellitus	15
1.1.5. Generalidades del hígado	16
1.2. Diabetes mellitus e HGNA	17
1.2.1. Tratamiento farmacológico	18
1.3. Medicina tradicional	20
1.4. Género <i>Eryngium</i> L.	20
1.5. <i>Eryngium carlinae</i>	21
1.5.1. JUSTIFICACIÓN	24
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSIÓN	41
7. Análisis fitoquímico del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i>	41
7.1. Actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> <i>in vitro</i>	41
7.2. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> <i>in vivo</i>	42

7.3. Actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i>	43
7.4. Actividad antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i>	46
8. RESUMEN DE RESULTADOS	48
9. CONCLUSIÓN	49
10. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la estreptozotocina	12
Figura 2. Teoría del doble impacto	18
Figura 3. <i>Eryngium carlinae</i>	22
Figura 4. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>Eryngium carlinae</i>	33
Figura 5. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre los niveles de glucosa	34
Figura 6. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre el porcentaje de ganancia de peso corporal	34
Figura 7. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre el contenido de TAG en hígado	36
Figura 8. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre la producción de ERO	36
Figura 9. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y SOD mitocondrial.	37
Figura 10. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de hígado	37
Figura 11. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre la actividad de los complejos mitocondriales	38
Figura 12. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre la expresión del factor de transcripción NF- κ B	39
Figura 13. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre la expresión de la enzima iNOS	39
Figura 14. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre la expresión de la enzima COX-2	40
Figura 15. Mecanismo de acción hipotético del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i>	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i>	33
Tabla 2. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de <i>E. carlinae</i> sobre parámetros bioquímicos y perfil hepático.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
·OH	Radical hidroxilo
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
CEH	Células estrelladas hepáticas
CK	Células de Kupffer
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CTE	Cadena transportadora de electrones
DM	Diabetes mellitus
DME	Diabetes mellitus experimental
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracil
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FA	Fosfatasa alcalina
GLUT	Transportador de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HNE	4-hidroxi-trans-2-nonenaL
IC50	Concentración inhibitoria 50
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun
MDA	Malondialdehído
MS	metabolitos secundarios
NAC	Norte América y El Caribe
NF-κB	Factor nuclear κB
NO·	Óxido nítrico sintasa inducible
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización mundial de la salud
PGA	Productos finales de glicación avanzada
PPAR-γ	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas-γ
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP-1c	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilglicerol
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico principalmente a Dios por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi padre **Rodolfo Trejo Juárez** quien con su amor, esfuerzo y apoyo me ha permitido llegar a cumplir hoy una meta más.

A mi madre **Martha Cristina Hurtado Lázaro** que a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos, sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí.

A mi hermano **Rodolfo Fco. Trejo Hurtado** por estar siempre presente incluso a la distancia, y sobre todo por el amor incondicional que nos tenemos.

A mi compañero de vida **Juan Carlos Carranza García** quien me brindó su compañía en todo momento, pero sobre todo su amor y apoyo incondicional.

Y finalmente, a todas las ratitas de experimentación que dieron su vida para la elaboración de este trabajo de investigación, ya que sin ellas esto no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** y en particular al **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas** por contribuir en mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto de investigación.

A mi asesor, el **Dr. Alfredo Saavedra Molina** por brindarme la oportunidad formar parte de equipo de trabajo, su asesoría, confianza y apoyo durante la realización de este trabajo.

A los doctores **Salvador Manzo Avalos, Rafael Salgado Garciglia y Alejandra Hernández García** por brindarme su asesoría, apoyo y conocimiento, que enriquecieron mi formación durante la realización de este proyecto en su laboratorio.

A los doctores **Rocío del Carmen Montoya Pérez, Asdrúbal Aguilera Méndez, Ernesto García Pineda y Rafael Salgado Garciglia**, por formar parte de mi comité tutorial, por sus observaciones y aportaciones que enriquecieron este proyecto de investigación a lo largo de su desarrollo.

A la **QFB. Mónica Clemente Guerrero** por el apoyo y amabilidad brindada a lo largo del desarrollo del proyecto.

Al **M en C Donovan Javier Peña Montes** por brindarme su asesoría para la realización de los experimentos y el manejo de las ratitas. Y junto con mis otros **compañeros del Laboratorio de Bioquímica** por sus observaciones y sugerencias brindadas, pero sobre todo gracias por su amistad y los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

RESUMEN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico que se caracteriza por un estado de hiperglucemia, la cual contribuye al mantenimiento de un ambiente oxidante. Una de las complicaciones derivadas de la diabetes que ha sido pasada por alto es la enfermedad de hígado graso no alcohólica, ya que se ha reportado que bajo condiciones de hiperglucemia el hígado es uno de los principales órganos que está sujeto a la disfunción y muerte celular mediante el efecto del estrés oxidante y el estado de inflamación. Por lo que el estrés oxidante y la inflamación pueden considerarse blancos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes. El presente estudio se llevó a cabo con el fin de determinar el efecto antioxidante y antiinflamatorio de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* en un modelo de ratas con diabetes experimental inducida con estreptozotocina. Para ello, se realizaron pruebas *in vitro* para conocer el potencial del extracto empleando los ensayos DPPH* para medir la actividad antiradical y poder reductor para la cuantificación de la capacidad reductora. Asimismo, se determinó el grupo de metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto responsables del efecto antioxidante. Una vez que se comprobó la actividad *in vitro* se realizaron estudios *in vivo* utilizando 32 ratas macho Wistar de un peso promedio de 300 g, las cuales se dividieron de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: diabético y normoglucémico control; y diabético y normoglucémico + *E. carlinae*. La inducción de diabetes se realizó mediante una única inyección intraperitoneal de STZ (45 mg/kg). Las ratas que presentaron niveles de glucemia >250 mg/dL se seleccionaron para formar parte de los grupos diabéticos. El tratamiento se realizó vía oral con aceite mineral y extracto a una dosis de 30 mg/kg en un periodo de 60 días. Al finalizar el tratamiento, se llevó a cabo la disección del hígado para la obtención de homogenado para la determinación de la concentración de triacilgliceroles (TAG) hepáticos, la actividad de la enzima catalasa y la expresión del factor de transcripción NF- κ B y de las enzimas inducibles iNOS y COX-2; y la obtención de mitocondrias a partir de las cuales se evaluó la producción de ERO, la peroxidación de lípidos, la actividad de los complejos mitocondriales y de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Además, se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa y TAG y los marcadores de daño hepático alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FA). Los resultados obtenidos de los ensayos para determinar la actividad antioxidante *in vitro* demuestran que el extracto de acetato de etilo de *E. carlinae* posee actividad antioxidante dosis dependiente con un IC_{50} = 57.97 mg/mL para la inhibición del radical DPPH*, mientras que la IC_{50} para la capacidad reductora fue de 30.90 mg/mL. La administración del extracto en ratas diabéticas a 30 mg/kg disminuyó los niveles de TAG séricos y hepáticos, disminuyó los marcadores de estrés oxidante y promovió la actividad de las enzimas antioxidantes. Así mismo, atenuó el daño hepático disminuyendo un factor de transcripción que conduce a la inflamación y los marcadores de daño hepático, de forma que el extracto de acetato de etilo de *E. carlinae* posee actividad antioxidante, antiinflamatoria, hipolipidémica y hepatoprotectora. Sin embargo, a pesar de que no redujo los niveles de glucosa en sangre ni disminuyó los niveles de expresión de la enzima COX-2, el extracto posee potencial para su uso de forma complementaria a fármacos antidiabéticos para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad hepática durante la diabetes mellitus.

Palabras clave: Diabetes, *Eryngium carlinae*, hígado, antioxidante, antiinflamatorio, estrés oxidante.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by a state of hyperglycemia, which contributes to the maintenance of an oxidizing environment. One of the complications derived from diabetes that has been overlooked is non-alcoholic fatty liver disease, since it has been reported that under hyperglycemic conditions the liver is one of the main organs that is subject to dysfunction and cell death due to oxidative stress and inflammation. Therefore, oxidative stress and inflammation can be considered therapeutic targets for the treatment of diabetes. The present study was carried out in order to determine the antioxidant and anti-inflammatory effect of the secondary metabolites present in the ethyl acetate extract of *Eryngium carlinae* inflorescences on streptozotocin-induced diabetic rats. *In vitro* assays were carried out to know the potential of the extract using DPPH^{*} assay to measure anti-radical activity and reducing power to measure reducing capacity. In addition, the group of the major secondary metabolites present in the extract responsible for the antioxidant activity was determined. Once the *in vitro* activity was verified, *in vivo* studies were carried out using 32 male Wistar rats around 300 g, which were randomly divided into 4 experimental groups: diabetic and normoglycemic control; and diabetic and normoglycemic + *E. carlinae*. The induction of diabetes was carried out by a single intraperitoneal injection of STZ (45 mg / kg). Rats with blood glucose levels >250 mg/dL were selected to be part of the diabetic groups. The treatment was administered orally with mineral oil and extract at a dose of 30 mg / kg over a period of 60 days. At the end of the treatment, the liver was dissected to obtain a homogenate to determine the concentration of liver triacylglycerols (TAG), the activity of the catalase enzyme and the expression of the transcription factor NF-κB as well as the levels of the inducible enzymes iNOS and COX-2; were obtain mitochondria from which ROS production, lipid peroxidation, the activity of mitochondrial complexes and the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) were evaluated. In addition, biochemical parameters of glucose and TAG and liver damage markers alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (FA) were determined. The results obtained to determine the antioxidant activity *in vitro* show that the ethyl acetate extract of *E. carlinae* has dose-dependent antioxidant activity with an IC₅₀ = 57.97 mg/mL for the inhibition of the DPPH^{*} radical, while the IC₅₀ for the reducing capacity it was 30.90 mg/mL. The oral administration of the extract 30 mg/kg in diabetic rats decreased serum and liver TAG levels, decreased oxidative stress markers and promoted the activity of both antioxidant enzymes. Likewise, it attenuated liver damage by decreasing a transcription factor that leads to inflammation and liver damage markers, so that the ethyl acetate extract of *E. carlinae* has antioxidant, anti-inflammatory, hypolipidemic and hepatoprotective activity. However, even though it did not reduce blood glucose levels nor decrease the expression levels of the COX-2 enzyme, the extract has potential for its use in addition to antidiabetic drugs for the treatment and/or prevention of a liver disease during diabetes mellitus.

Keywords: Diabetes, *Eryngium carlinae*, liver, antioxidant, anti-inflammatory, oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es clasificada como un desorden metabólico, ya que se entiende por metabolismo a la forma en que el cuerpo emplea los alimentos para la obtención de energía y el crecimiento. Además, se caracteriza por un incremento de glucosa en sangre (hiperglucemia), que resulta por la deficiente producción de insulina por el páncreas o bien por la acción no efectiva de la insulina (Ullah *et al.*, 2016).

La insulina posee una función importante en la homeostasis de la glucosa, lípidos y proteínas; además participa en la proliferación y diferenciación celular. Esta hormona es secretada por las células β del páncreas como respuesta a un incremento en la concentración de glucosa. La insulina en su función principal, estimula el transporte de la glucosa a las células del músculo y tejido adiposo, mientras que en el hígado reduce la producción de glucosa vía la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Por otro lado, la insulina participa en la regulación del metabolismo de lípidos incrementando la síntesis en hígado e inhibiendo la lipólisis en tejido adiposo. Además, es necesaria para el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas (Rains y Jain, 2011). Por lo que una deficiencia o insensibilidad de la insulina, además de no estimular el transporte de glucosa hacia órganos dependientes de insulina, causa anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Los síntomas asociados a la hiperglucemia son similares en la diabetes tipo 1 y 2; sin embargo, son más comunes y se desarrollan más rápido en la diabetes mellitus tipo 1 (Guyton y Hall, 2011; Lal, 2016). Estos síntomas incluyen la poliuria (alta producción de orina), polidipsia (incremento en la sensación de sed), polifagia (aumento en la sensación de hambre), pérdida de peso, fatiga, entre otros.

1.1.1. Clasificación de la diabetes mellitus

Desde la primera clasificación de la DM por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1980 e incluso en su modificación en 1985, se han descrito tres grandes categorías, la diabetes mellitus tipo 1 o dependiente de insulina (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 o no dependiente de insulina (DMT2) y la diabetes mellitus gestacional (DMG) (WHO, 1999).

Sin embargo, la diabetes no solo es propia de los seres humanos sino que también puede ocurrir en una gran variedad de especies animales como en los perros, gatos, ganado, conejos, monos, entre otros. Es por ello, que a través de la historia en la investigación de la enfermedad, se ha realizado experimentación en animales, particularmente en roedores mediante la inducción de diabetes (diabetes experimental, DME) a través del uso de diversas técnicas experimentales (Mordes y Rossini, 1981; Karamanou *et al.*, 2016).

1.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1

La DMT1 es una condición en que la hiperglucemia se debe a una deficiencia de insulina, como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, por lo que se considera una enfermedad autoinmune (Ozougwu *et al.*, 2013; Katsarou *et al.*, 2017).

1.1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2

La DMT2 es caracterizada por una disminución en la sensibilidad a la insulina por tejidos como el hígado, músculo y tejido adiposo (resistencia a la insulina) contribuyendo a la producción de glucosa por el hígado y a una disminución del transporte de glucosa por el músculo y tejido adiposo; y a una secreción de insulina no efectiva por las células β del páncreas (disfunción de células β), resultando en niveles insuficientes de insulina para mantener el nivel de glucosa normal (Zheng *et al.*, 2018).

1.1.1.3. Diabetes mellitus gestacional

La DMG es una condición que ocurre durante el embarazo, en la cual una mujer sin padecer algún tipo de diabetes previo a la gestación, desarrolla un grado de hiperglucemia y desaparece después del parto. Esta hiperglucemia se caracteriza por una deficiencia en la producción de insulina para compensar el incremento de resistencia a la insulina promovida por las hormonas producidas por la placenta (progesterona) durante el embarazo (Law y Zhang, 2017; Plows *et al.*, 2018).

1.1.1.4. Diabetes mellitus farmacológica o experimental

La DME es la enfermedad inducida en animales de laboratorio con la finalidad de obtener información de la condición patológica de la diabetes y asimismo para encontrar nuevas terapias para tratar dicha enfermedad. Existen reportes en la literatura acerca de una gran variedad de modelos animales y procedimientos experimentales para la inducción de diabetes.

Dentro de los modelos animales se encuentran los gatos, perros, cerdos y primates; sin embargo, los roedores son la principal elección como modelo biológico. Algunos de los procedimientos experimentales incluyen cirugía de remoción del páncreas, modificaciones genéticas, dietas altas en grasas y carbohidratos, terapias de hierro o esteroides, entre otros. El método que se emplea frecuentemente es la inducción química mediante la aplicación de compuestos como la estreptozotocina (STZ por sus siglas en inglés *streptozotocin*) y aloxano, los cuales son fármacos citotóxicos selectivos a los islotes pancreáticos e incluso de las células β del páncreas, conduciendo a un estado de hiperglucemia (Usman *et al.*, 2015; Radenković *et al.*, 2016).

En particular, la STZ es un compuesto análogo de nitrosourea, en el que la parte N-metil-N-nitrosourea se encuentra unido al carbono 2 de una hexosa, lo cual hace que la molécula sea de carácter hidrofílica (Figura 1). Debido a ello y a su similitud con la estructura de la glucosa, la STZ ingresa y se acumula en las células β del páncreas a través de los transportadores GLUT-2 promoviendo el desarrollo de diabetes dependiente de insulina. La citotoxicidad de la STZ se da a través de la alquilación del ADN y de la disminución de NAD^+ y ATP en un intento de reparar el ADN dañado por la poli (ADP-ribosa) sintetasa. Aunado a ello la parte N-metil-N-nitrosourea es capaz de liberar óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), el cual induce estrés nitrosativo/oxidativo y alteraciones en la función

mitocondrial, y finalmente muerte celular; causando una inhibición en la síntesis y secreción de la insulina (Radenković *et al.*, 2016; Al Nahdi *et al.*, 2017).

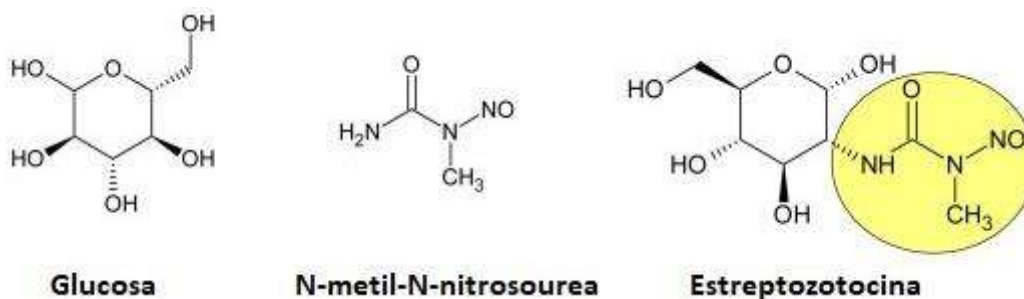


Figura 1. Estructura química de la estreptozotocina.

1.1.2. Epidemiología

La DM es una enfermedad que posee un gran impacto en la vida de las personas en todo el mundo. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes a finales del 2019, alrededor de 463 millones de personas de entre 20 y 79 años ya contaban con esta condición y se espera que para el año 2045 haya un incremento del 51%. Siendo la región de Norte América y el Caribe (NAC) la que ocupa el quinto lugar con 48 millones de personas con DM y se estima que para el 2045 alcance los 63 millones (incremento del 33%). Uno de los principales potenciadores del problema es que 1 de cada 2 personas con DM no está diagnosticada (~232 millones de personas), además de que el 79.4% de personas adultas con DMT2 viven en países con bajos y medianos ingresos lo cual complica el acceso a un tratamiento (International Diabetes Federation, 2019).

Dentro de los países con mayor número de personas con DMT2, se encuentra México, que ocupa el sexto lugar a nivel mundial y el segundo dentro de la región de NAC con 12.8 millones de personas diabéticas (International Diabetes Federation, 2019). En México, la DM es la segunda causa de muerte seguida de enfermedades cardiovasculares con 101,257 defunciones durante el 2018, siendo el 2.12% de los casos atribuidos a la DMT1 (INEGI, 2019). Los estados con mayor número de personas con DMT2 (12-14% de la población) en México son Campeche, Hidalgo, Ciudad de México, Nuevo León, Coahuila y Tabasco (Instituto Nacional de Salud Pública, 2018).

1.1.3. Factores de riesgo

Existen factores de riesgo asociados al desarrollo de algún tipo de diabetes, los cuales se pueden modificar o controlar. Sin embargo, existen aquellos como la genética que no pueden ser modificados.

En la DMT1, los tipos de auto anticuerpos que primero se presentan, dependen de factores ambientales, inmunes y genéticos los cuales desencadenan la enfermedad (Katsarou *et al.*, 2017; Sobhi y Khenchouche, 2020). Mientras que los factores de riesgo biológicos, de estilo de vida y de comportamiento que contribuyen a la prevalencia de la DMT2, incluyen predisposición genética,

sobrepeso u obesidad, incremento de edad, dieta no saludable, sedentarismo, fumar, antecedentes de diabetes gestacional e inactividad física (DeFronzo *et al.*, 2015).

La mayoría de estos factores de riesgo contribuyen a un ambiente oxidante, el cual puede alterar la sensibilidad a la insulina ya sea por un daño a la tolerancia a la glucosa o por un incremento a la resistencia a la insulina. Por lo que el estrés oxidante es uno de los principales factores de riesgo en el comienzo y en la progresión de la diabetes. Esta última debido a que la hiperglucemia como resultado de la DM, contribuye al mantenimiento de un ambiente oxidante (Rains y Jain, 2011).

1.1.3.1. Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como “*un desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, conduciendo una disrupción de la señalización y control redox y daño molecular*” (Sies y Jones, 2007).

El oxígeno, a pesar de ser uno de los principales componentes para la vida, es una especie altamente reactiva que puede convertirse en una molécula potencialmente nociva generando especies reactivas de oxígeno (ERO) o radicales libres. Los radicales libres son aquellos átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados, los cuales al aparear su electrón desapareado con el de otras moléculas, causan la oxidación de la molécula. Los radicales libres derivados del oxígeno llamados especies reactivas de oxígeno, incluyen al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). Además, las ERO también incluyen moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ďuračková, 2008; Rains y Jain 2011; Jebur *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2016).

Las ERO en cantidades moderadas juegan un papel importante como moléculas señalizadoras, así como bioproductos de varias reacciones enzimáticas, que se llevan a cabo en diferentes compartimentos celulares como parte del metabolismo basal. Sin embargo, las ERO en grandes cantidades dependiendo de la fuente, el tipo celular y tejido, pueden conducir al daño celular, disfunción metabólica y una señalización inflamatoria, contribuyendo a la fisiopatología de la DM (Forrester *et al.*, 2018).

Los antioxidantes en cambio, se pueden definir como “cualquier sustancia que directamente secuestra ERO o indirectamente actúa para regular las defensas antioxidantes o inhibir la producción de ERO” (Khlebnikov *et al.*, 2007). La actividad de los antioxidantes puede efectuarse por distintas vías como la inhibición de las reacciones de oxidación, las reacciones en cadena de auto oxidación y de enzimas prooxidativas, quelantes de metales, entre otras (Carocho y Ferreira, 2013).

El sistema endógeno antioxidante está dividido principalmente en dos categorías: enzimático y no enzimático. El sistema enzimático se compone de enzimas que previenen la formación o bien neutralizan los radicales libres, las cuales son el glutatión peroxidasa (GPx) que dona dos electrones para la reducción de H_2O_2 a agua mediante la oxidación del glutatión; la catalasa que convierte el H_2O_2 en agua y oxígeno molecular; y la enzima superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Además, intervienen dos enzimas que son de apoyo a otros antioxidantes, la glutatión reductasa (GR) que reduce al glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida GSH a través de la

oxidación de NADPH a NADP⁺, de forma que ayuda a reciclar el glutatión para que éste pueda neutralizar más radicales libres; y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que regenera NADPH, el cual es un cofactor para la enzima GR, a partir de la reducción de NADP⁺; por lo que es determinante para la capacidad amortiguadora del glutatión GSH (GSH/GSSG).

En cambio, el sistema antioxidante no enzimático se comprende de compuestos de bajo peso molecular, los cuales son vitaminas como la vitamina A (ácido retinoico), carotenoides que poseen la habilidad de combinarse con radicales peroxilo (HO₂), evitando la propagación de la peroxidación de lípidos; la vitamina C (ácido ascórbico) neutralizando radicales libres en agua e hidroperóxidos de alcohol; la vitamina E (α-tocoferol) al estabilizar los radicales lipídicos evita la propagación de la peroxidación lipídica; cofactores enzimáticos como la coenzima Q₁₀ que previene o neutraliza HO₂ de lípidos y participa en la regeneración de la vitamina E; compuestos nitrogenados como el ácido úrico, el cual es un potente secuestrador de ·OH y oxígeno singulete (¹O₂); y péptidos como el glutatión (GSH), el cual es un tripéptido (γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina), que actúa en diferentes formas: participa en la detoxificación de H₂O₂ y HO₂ de lípidos vía GPx, reduce H₂O₂ en agua y O₂, dona protones a los lípidos de membrana para protegerlos contra ataques oxidantes, es cofactor de enzimas detoxificantes, regenera la vitamina C y E a su estado activo y protege a las células de la muerte celular programada (apoptosis) al interactuar con vías de señalización pro y antiapoptóticas (Birben *et al.*, 2012; Caroch y Ferreira, 2013; Neha *et al.*, 2019).

A pesar de que el sistema endógeno antioxidante es eficiente en la eliminación de ERO, no es suficiente para contrarrestar los efectos cuando las ERO son producidas en exceso debido a alguna condición fisiopatológica. Es por ello que muchos organismos dependen de varios tipos de antioxidantes presentes en la dieta (sistema antioxidante exógeno), los cuales en su mayoría provienen de plantas. Dentro de este sistema antioxidante encontramos a las vitaminas, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, carotenoides, entre otros (Carlsen *et al.*, 2010; Caroch y Ferreira, 2013).

1.1.4. Estrés oxidante e hiperglucemia

La hiperglucemia se ha visto implicada como un estimulador del estrés oxidante ya que media una sobreproducción de ERO y una disminución del sistema antioxidante mediante la sobreexpresión de las vías glucolítica y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa, lo cual conduce a una sobreproducción de donadores de electrones (NADH y FADH₂), aumento en la proporción ATP/ADP y alteración del potencial de membrana, lo que a su vez resulta en la generación de O₂^{•-} (por el complejo III de la cadena transportadora de electrones (CTE)) que puede convertirse en ONOO⁻, H₂O₂ y ·OH (Wetzels *et al.*, 2017).

Otro factor incluye la sobreexpresión de la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa (NOX/DUOX), que además es activada por las proteínas cinasa PKC-α y PKC-γ, y los productos finales de glicación avanzada (PGA). Los PGA son generados a través de la glicación de proteínas e incluso de enzimas como la SOD por el glioxal y metilglioxal, formados por la auto oxidación de glucosa. La interacción de los PGA con su receptor al generar ERO, daña la estructura de la matriz extracelular alterando las interacciones entre las células y proteínas; éstas a su vez, activan al factor de

transcripción sensible al estado óxido–reductivo NF- κ B estimulando la transcripción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez, 2007; Giri *et al.*, 2018).

Adicionalmente, la hiperglucemia favorece la activación de vías metabólicas que conducen a la generación de ERO; entre ellas se encuentran: La vía de los polioles, en la cual el 30% de la glucosa en condiciones de hiperglucemia resulta en la depleción del NADPH y por ende a una disminución de la actividad antioxidante del glutatión, generando así un daño en el balance redox. La activación de la PKC- β a través de la sobreproducción de ERO, lo que conlleva a la supresión de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, lo cual conduce a una acumulación de intermediarios glucolíticos dentro de los cuales el diacilglicerol activa a la PKC quien a su vez es responsable de la expresión de TGF- β , la formación de la NOS endotelial y activación del NF- κ B y VEGF, conduciendo a la transcripción de genes inflamatorios; y la vía de las hexosaminas, la cual resulta en una acumulación de UDP-N-acetilglucosamina, un sustrato para la O-GlcNAcilación (glicosilación) de proteínas. Por ejemplo en hígado se sobreexpresan enzimas de gluconeogénesis y disminuye la actividad de la glucógeno sintasa vía O-GlcNAcilación (Rosado-pérez y Mendoza-núñez, 2007; Geraldés y King, 2010; Giri *et al.*, 2018).

1.1.5. Complicaciones de la diabetes mellitus

Las complicaciones de la DM se derivan de un estado de hiperglucemia crónica que conduce al daño de los vasos sanguíneos como resultado de la glicación de proteínas de manera irreversible, alteración del estado redox, de un incremento del estrés oxidante y del estado inflamatorio y disfunción endotelial. Lo cual, resulta en el desarrollo de complicaciones microvasculares si el daño ocurre en los vasos sanguíneos pequeños como en la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía; y macrovasculares si el daño es a los vasos sanguíneos largos dentro de las que encontramos a la enfermedad coronaria, cerebrovascular y arterial periférica (Cade, 2008; Forbes y Cooper, 2013; Domingueti *et al.*, 2016)

A diferencia de las complicaciones vasculares antes mencionadas, la enfermedad hepática crónica ha sido pasada por alto como otra complicación derivada de la diabetes. Sin embargo, se ha reportado que en condiciones de hiperglucemia, el hígado es uno de los principales órganos que está sujeto a la disfunción y muerte celular mediante el efecto del estrés oxidante (Manna *et al.*, 2010; Bhatt y Smith, 2015).

La hiperglucemia es una de las causas para la progresión del hígado a hígado graso no alcohólico (HGNA) que se caracteriza por la acumulación de lípidos en el hígado, esta enfermedad puede en algunos de los casos progresar de a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), en la que hay evidencia de inflamación; la cual a su vez si no es controlada puede progresar a cirrosis (fibrosis hepática), posteriormente hepatocarcinoma y finalmente fallo hepático (Bhatt y Smith, 2015; Mohamed *et al.*, 2016; Vasconcelos Barros *et al.*, 2017).

En pacientes con DMT1 la prevalencia del HGNA es del 44% y se encuentra asociado con el desarrollo de las enfermedades cardiovascular y daño renal crónica, retinopatía y polineuropatía. En cambio en pacientes con DMT2, la prevalencia global es del 55%, mientras que la prevalencia de EHNA es

del 37.7%. Por lo cual, el HGNA es reconocida como la enfermedad crónica del hígado con más prevalencia en personas con DM (Singh *et al.*, 2018; Younossi *et al.*, 2019).

Sin embargo, en México, la DM es uno de los principales factores para el desarrollo del HGNA con una prevalencia del 50%, mientras que el desarrollo de EHNA es del 18.5% en la población mexicana. De acuerdo a los datos del Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones, entre los años 2010 a 2019, las enfermedades del hígado se encontraron dentro de las 5 principales causas de muerte en México, particularmente debido a que es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares o carcinoma hepático (Bernal-Reyes *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2017; Escobedo López, 2018; Bernal-Reyes *et al.*, 2019).

1.2. Generalidades del hígado

El hígado es órgano compuesto de una masa parenquimatosa continua que se encuentra penetrada de redes de vasos sanguíneos aferentes y eferentes. La irrigación sanguínea que recibe proviene de dos fuentes: el 25% proviene de la arteria hepática, la cual es rica en oxígeno y el 75% que resta, es rica en nutrientes y proviene del intestino a través de la vena porta hepática. El peso del hígado de un humano adulto es de entre 1300 y 1700 g dependiendo del peso del cuerpo y del sexo (2% del peso del cuerpo), mientras que el hígado de los roedores es relativamente grande comprendiendo del 4-5% del peso del cuerpo (Lammert y Zeeb, 2014; Arias *et al.*, 2020).

De acuerdo a la apariencia externa, el hígado está dividido en la superficie anterior en 2 lóbulos anatómicos izquierdo y derecho (divididos por el ligamento falciforme); en cambio en la superficie posterior el hilio hepático delimita 2 lóbulos adicionales, en la parte media superior se encuentra el lóbulo caudado y en la parte media inferior el lóbulo cuadrado (Rodés *et al.*, 2007).

Histológicamente el 70% de la masa celular hepática está constituido de células del parénquima hepático (hepatocitos), mientras que el 30% está comprendido por células no parenquimatosas, las cuales incluyen macrófagos residentes denominados células de Kupffer (CK), células estrelladas hepáticas (CEH), células endoteliales y células granulares (Rodés *et al.*, 2007).

Los diferentes tipos celulares conforman la placa celular hepática, la cual es la unidad funcional y estructural del hígado. A lo largo de la placa se encuentran de entre 20 a 30 hepatocitos, los cuales debido a la formación de un gradiente de metabolitos, hormonas y oxígeno y a las señales celulares de células vecinas, da lugar a una zonación metabólica haciendo que los hepatocitos lleven a cabo diferentes funciones dependiendo de su ubicación (Lammert y Zeeb, 2014).

Las principales funciones del hígado son: procesar y almacenar nutrientes, y garantizar el suplemento de nutrientes hacia otros órganos; detoxificar y excretar xeno- y endobióticos a la vesícula biliar; participar en la respuesta inmune y disparar la respuesta de la fase agua de la inflamación; y llevar a cabo funciones de homeostasis como el de la glucosa, el metabolismo y transporte de lípidos (TAG y colesterol), el procesamiento y secreción de hormonas y la síntesis de ácidos biliares y de proteínas plasmáticas, y el metabolismo del amonio y la regulación metabólica del pH sistémica a través de la síntesis de urea (Rodés *et al.*, 2007; Lammert y Zeeb, 2014).

El hígado es un órgano importante que ofrece un sitio adecuado para varias funciones metabólicas por lo que es capaz de metabolizar glucosa, ácidos grasos y varios aminoácidos obtenidos de la dieta. Estos sustratos son transportados hacia el interior de los hepatocitos a través de transportadores de membrana, en el caso de la glucosa se han documentado la expresión de 4 isoformas de GLUT: GLUT-1, GLUT-2, GLUT-9 y GLUT-10, siendo el GLUT-2 el principal transportador de glucosa de flujo bidireccional en hepatocitos. Mientras que los lípidos son transportados a su interior mediante proteínas de transporte de ácidos grasos PTAG 2, 4 y 5, proteínas CD36 (transportan junto con translocasas ácidos grasos de cadena larga) y caveolina 1 (las cuales además participan en la formación de gotas de lípidos) (Rodés *et al.*, 2007; Karim *et al.*, 2012; Rui, 2017; Højland Ipsen *et al.*, 2018).

1.2. Diabetes mellitus e HGNA

Los procesos que se llevan a cabo durante el metabolismo de la glucosa y de los lípidos en el hígado están regulados por hormonas y factores de transcripción manteniendo la homeostasis bajo control. Sin embargo, en condiciones de hiperglucemia debido a la ausencia o resistencia a la insulina se conduce a una desregulación de factores de transcripción contribuyendo a la interrupción de una o más vías metabólicas y subsecuentemente al desarrollo de una enfermedad hepática como el HGNA (Rui, 2017; Højland Ipsen *et al.*, 2018).

El HGNA es considerada la enfermedad crónica más común del hígado que se caracteriza por la presencia de depósitos de lípidos mayor al 5-10% debido a un desbalance en la adquisición y disposición de TAG por parte del hígado (Bhatt y Smith, 2015; Watt *et al.*, 2019).

Existe una teoría denominada “teoría del doble impacto” que intenta explicar el origen del HGNA (Figura 2). En un primer impacto se lleva a cabo la esteatosis o acumulación de lípidos, ya que debido a la resistencia a la insulina, la lipasa sensible a hormonas favorece la lipólisis en el tejido adiposo liberando y favoreciendo el transporte de ácidos grasos libres hacia el hígado y su esterificación a TAG. Además, existe un aumento en la lipogénesis *de novo* a través de la regulación transcripcional de SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador de esteroides por sus siglas en inglés), promoviendo la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (Day y James, 1998; Leavens y Birnbaum, 2011; Aguilera-Méndez, 2018; Højland Ipsen *et al.*, 2018).

Por otro lado, la disposición de lípidos a través de la exportación de TAG en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés) es considerada bifásica ya que en un inicio la exportación se muestra incrementada, no obstante al progresar la enfermedad los niveles de los componentes clave en la formación de las VLDL disminuyen, limitándose así la exportación de TAG y contribuyéndose su acumulación. Aunado a ello, en las mitocondrias la β -oxidación aumenta en un intento de reducir la carga de lípidos; sin embargo, esto conlleva a una producción de ERO, las cuales se ven incrementadas al disminuirse la capacidad del sistema antioxidante promoviéndose una disfunción mitocondrial y por ende un estado de estrés oxidante (oxidación y exportación en VLDL).

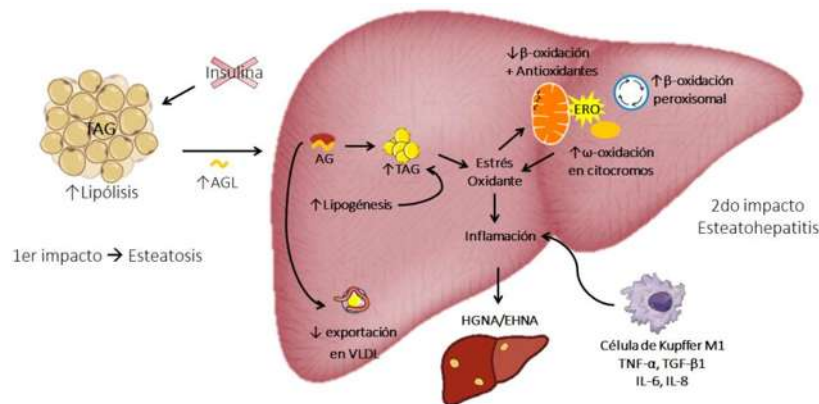


Figura 2. Teoría del doble impacto. AG: ácidos grasos; AGL: ácidos grasos libres; ERO: especies reactivas de oxígeno; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólico; TAG: triacilglicéridos; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. Figura tomada y modificada de (Aguilera-Méndez, 2018; Højland Ipsen *et al.*, 2018; Martín Domínguez *et al.*, 2013)

El segundo impacto se origina gracias al estrés oxidante, el cual se da partir de la lipotoxicidad generada a través de la acumulación de lípidos. El estrés oxidante generado conduce a la oxidación de ácidos grasos mediada a través de los peroxisomas y citocromos como un mecanismo compensatorio. Este proceso además de generar grandes cantidades de ERO durante la oxidación, conducen al daño oxidativo de lípidos de membrana mitocondriales (peroxidación lipídica), exacerbando el estado oxidante y promoviendo la progresión de la enfermedad (Martín Domínguez *et al.*, 2013; Aguilera-Méndez, 2018; Højland Ipsen *et al.*, 2018).

Por otro lado, la acumulación de lípidos activa vías de señalización que promueven la muerte celular a través de la activación de la proteína cinasa JNK (cinasa N-terminal c-Jun) y la inflamación a través de la vía NF-κB (por sus siglas en inglés factor nuclear kappa B) vía estrés del retículo endoplasmático. Además, las ERO pueden contribuir a un estado inflamatorio ya que conduce a la activación de los macrófagos residentes (CK), liberando así citocinas proinflamatorias tales como TNFα, TGF-β1, IL-8, IL-6 e IL-1β; y al reclutamiento de células inmunes como las natural killer, linfocitos B y macrófagos derivados de monocitos. Finalmente, la liberación de citocinas por parte de las CK amplifica el daño en hígado al promover la activación de las CEH y a la síntesis y deposición de colágeno en los sinusoides hepáticos, conduciéndose la progresión de una esteatosis a una esteatohepatitis y fibrosis (Alisi *et al.*, 2017; Cha *et al.*, 2018; Pierantonelli y Svegliati-Baroni, 2019; Arroyave-Ospina *et al.*, 2021).

1.2.1. Tratamiento farmacológico

El tratamiento contra el HGNA en pacientes con DM se basa en la reducción en la acumulación de lípidos y en detener la progresión de la inflamación y fibrosis. Dentro del tratamiento farmacológico se encuentran agentes sensibilizadores de insulina y agentes no antidiabéticos (Kashanian y Fuchs, 2015; Kim *et al.*, 2019).

Dentro de los sensibilizadores de la insulina se encuentran las tiazolidinedionas: pioglitazona y rosiglitazona, las cuales mediante la unión a PPAR- γ (receptor activado por el proliferador de peroxisomas- γ) en tejido adiposo actúan sobre las vías metabólicas, incrementando el transporte de glucosa dependiente de insulina (en músculo y tejido adiposo) y los niveles de adiponectina, la cual incrementa la sensibilidad a la insulina, disminuye la gluconeogénesis y promueve la oxidación de ácidos grasos en hígado (Gastaldelli y Cusi, 2019; Kim *et al.*, 2019; Skat-Rørdam *et al.*, 2019; Eggleton y Jialal, 2020).

Los agonistas del receptor del péptido 1 similar al glucagón tales como el exenátido y liraglutido promueven una reducción de peso y mejoran la acción de la insulina a través de la reducción de la infiltración de macrófagos, mejorando la función mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos de los hepatocitos, resultando en una disminución de la esteatosis e inflamación (Abbasi-Oshaghi, 2017; Gastaldelli y Cusi, 2019).

Otro tipo de fármacos empleados también en el tratamiento de la DMT2 son los inhibidores de DPP-4 (Dipeptidil Peptidasa-IV) enzima involucrada en la degradación e inactivación de las incretinas endógenas GLP-1 y GIP. Este tipo de inhibidores independientemente de su efecto antidiabético (promoviendo la secreción de insulina), mejoran la esteatohepatitis suprimiendo la expresión de esta enzima en hígado, ya que se ha reportado que su expresión se asocia con el grado de esteatosis (Lee *et al.*, 2020). No obstante, hacen falta evidencia clínica para el empleo de este tipo de fármacos para el tratamiento de la HGNA/ EHNA.

Dentro de los agentes no antidiabéticos se encuentran los agentes reductores de lípidos como las estatinas, niacina, entre otros, los cuales muestran ser agentes eficaces en el manejo de la HGNA/ EHNA. En el caso de las estatinas además de poseer actividad hipocolesterolémica tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante los cuales disminuyen el ambiente inflamatorio y oxidativo, característico de la patología. La niacina por su parte, promueve el aumento de colesterol-HDL y disminuye los niveles de TAG y VLDL hepáticas reduciendo la movilización de ácidos grasos hacia el hígado, reduciéndose así la esteatosis hepática (McCormack y Keating, 2005; Nseir *et al.*, 2012; Keenan, 2018).

Sin embargo, la terapia farmacológica a pesar de ser considerada prometedora en el tratamiento del HGNA por mostrar un efecto potencial en ensayos *in vitro* e *in vivo*, se han reportado resultados poco positivos en los ensayos clínicos que confirmen su efectividad (Kim *et al.*, 2019).

No obstante, reportes en la literatura demuestran que el empleo de extractos o compuestos bioactivos aislados de plantas empleadas en la medicina tradicional, pueden prevenir o controlar el HGNA. Dentro de los compuestos bioactivos considerados prometedores para el tratamiento del HGNA se encuentran los polifenoles como la quercetina, curcumina, rutina, resveratrol, entre otros; terpenos tales como el ácido ursólico y la artemisina; saponinas como la dioscina; y alcaloides como la berberina, sofocarpina y la ruter-capina (Li *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2020; Mohammadipour *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020)

El efecto de estos compuestos lo ejercen a través de varios mecanismos de forma efectiva tales como disminuyendo el estrés oxidante incrementando el sistema antioxidante endógeno vía Nrf2, disminuyendo la acumulación de lípidos a través de la regulación de la vía AMPK bloqueándose así la expresión del factor de transcripción SREBP-1c, incrementando la β -oxidación, mitigando la inflamación suprimiendo la activación de NF- κ B, promoviendo la defensa antioxidante, entre otros (Xiao *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2020).

1.3. Medicina tradicional

De acuerdo con la OMS, la medicina tradicional es el conjunto de conocimientos y práctica basada en el uso de diferentes órganos de una planta considerada medicinal por diferentes culturas indígenas para la prevención y tratamiento de una enfermedad. De esta forma, una planta medicinal es aquella que posee compuestos bioactivos (metabolitos secundarios MS) que ejercen un efecto farmacológico o que puede ser empleados como precursor para el desarrollo de un fármaco (Bhardwaj *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2019)

Los MS son un grupo de compuestos químicos complejos sintetizados por las plantas en respuesta a un estrés biótico o abiótico producido por ejemplo por patógenos o cambios estacionales, respectivamente, impactando en su composición y producción. Los MS pueden clasificarse en cuanto a su estructura, composición, solubilidad en diferentes solventes o de acuerdo a la vía de síntesis, pero la más común es en las siguientes categorías: terpenos, los cuales incluyen hormonas, pigmentos, aceites esenciales, esteroides y esteroides; compuestos fenólicos dentro de los cuales se encuentran las cumarinas, flavonoides y taninos; y los compuestos nitrogenados que abarcan los alcaloides, glicósidos como las saponinas y glucosinolatos (Bhatla y Lal, 2018; Guerriero *et al.*, 2018).

Las plantas de acuerdo a la parte empleada (raíz, tallo, hoja, flor, semilla) y a su contenido de metabolitos secundarios, poseen diferente actividad biológica. Por ejemplo, la actividad anticancerígena se ha reportado debido a la presencia de carotenoides, polifenoles, curcumina y flavonoides; la actividad antioxidante se debe a la presencia de polifenoles, flavonoides, carotenoides, tocoferoles y ácido ascórbico, mientras que algunos taninos, flavonoides, cumarinas, fitoesteroides, saponinas y alcaloides poseen actividad antiinflamatoria (Kurmukov, 2013; Mohammed *et al.*, 2014; Rungsung *et al.*, 2015).

La extracción de los MS deseados depende de la elección del solvente a emplear, ya que la polaridad de la molécula determina su solubilidad. Si se desean extraer compuestos hidrofílicos se deben emplear solventes polares como el agua, metanol, etanol, mientras que si se desean extraer compuestos de naturaleza lipofílica se emplean solventes como el diclorometano o hexano (Sasidharan *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, el agua dado a su índice de polaridad (P') de 9.0 es capaz de extraer compuestos fenólicos, polisacáridos, mucílagos y alcaloides. El etanol (P' =5.2) posee la capacidad de extraer taninos, polifenoles, esteroides y alcaloides. Mientras que en acetato de etilo (P' =4.4) es posible encontrar terpenos y flavonoides. Y en un solvente con índice de polaridad de 0.0 (hexano) es posible extraer terpenos (Villar del Fresno, 1999).

1.4. Género *Eryngium* L.

México cuenta con al menos 300 especies de plantas pertenecientes a 93 familias documentadas con actividad hipoglucémica. Dentro de estas se encuentra la familia Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae, Agavaceae, Lamiaceae, Apiaceae, entre otras (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Eryngium L. es el género que comprende la mayor cantidad de especies (230-250) dentro de la familia Apiaceae, distribuidas en las regiones templadas y tropicales de Euroasia, África, América (zona centro occidente de México y centro oriente de sudaméricica) y Australia (García-Ruiz, 2015; Kikowska *et al.*, 2016).

Diversas especies de *Eryngium* L. se han empleado con fines ornamentales, alimenticios e incluso medicinales. Dentro de las actividades biológicas reportadas a las que se le atribuye su uso medicinal incluyen la actividad antimicrobiana, citotóxica, anticáncer, antifúngico, hipoglucémico, antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antidiabética, efectos contra el veneno de serpientes y escorpiones, entre otras (Wang, 2012; Sepanlou *et al.*, 2019).

Reportes en la literatura de la composición fitoquímica de las diferentes especies de *Eryngium* L. demuestran que la actividad biológica que poseen es debido a la gran variedad de metabolitos secundarios presentes. Principalmente contienen flavonoides, saponinas y aceites esenciales, además, es posible encontrar compuestos fenólicos y terpenoides, incluyendo saponinas triterpenoides, sesquiterpenos, cumarinas, esteroides, lactonas, acetilenos, oligosacáridos, entre otros (Wang, 2012; Erdem *et al.*, 2015).

Sin embargo, una gran mayoría de especies de *Eryngium* L. no se han investigado ampliamente en cuanto a sus constituyentes fitoquímicos y ni a su actividad biológica, dentro de ellas se encuentra *Eryngium carlinae*.

1.5. *Eryngium carlinae* F. Delaroche

E. carlinae comúnmente llamada hierba del sapo o cabezona, es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Apiaceae Lindley. Posee un tallo ramificado; hojas basales dispuestas en roseta densa con el margen espinoso, lámina de color verde con los nervios marcados de color blanco; inflorescencias compuestas de cabezuelas ovoides azul-violeta de 5-12 mm de largo y de 5-10 mm de ancho; y poseen brácteas generalmente espinosas con envés verde y haz blanquecino (Figura 2) (García-Ruiz, 2015).

Se distribuye ampliamente en las praderas, pastizales y bosques de encino, pino, pino y roble y coníferas de México en los estados de: Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas. Dentro del estado de Michoacán la podemos encontrar a lo largo de la sierra del centro y en la región de los Valles y Ciénegas que incluyen al municipio de Morelia (Bello-Gonzalez, 2006; García-Ruiz, 2015).



Figura 3. *Eryngium carlinae*.

En la medicina tradicional se ha empleado infusiones de *E. carlinae* para tratar diferentes afecciones tales como la tos, indigestión, enfermedades de la próstata, trastornos de los lípidos y diabetes (Bello-Gonzalez, 2006; Saavedra-Molina *et al.*, 2014).

Estudios previos sobre la planta, han demostrado la actividad hipolipidémica de un extracto etanólico de la parte aérea de *E. carlinae* (a una concentración de 30 mg/kg) en ratas con DME inducida con STZ, esto al reducir la hiperlipidemia relacionada con el desarrollo de una enfermedad cardiovascular sin alterar niveles de colesterol HDL (Noriega-Cisneros *et al.*, 2012, 2019); la actividad hipoglucémica y antihiperinsulinémica en un extracto acuoso de inflorescencias (0.6 g/día) en ratas con obesidad, además disminuyó el daño oxidativo, proteínas inflamatorias (incluyendo TNF- α e IL-6) y la acumulación de lípidos en riñón (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016); la actividad hipocolesterolémica e hipolipidémica de un extracto hidroalcohólico (70%) de la parte aérea (100 mg/kg) en ratones hipercolesterolémicos, al disminuir el colesterol total sin alterar los niveles de colesterol HDL (Castro-Torres *et al.*, 2017); la actividad antioxidante (*in vitro* e *in vivo*), hipoglucémica e hipolipidémica del extracto hexánico de inflorescencias (10 mg/mL *in vitro* y 30 mg/kg *in vivo*) en ratas con DME inducida con STZ al reducir significativamente el daño oxidativo a lípidos y proteínas, reducir los niveles de ERO, restaurar la actividad de enzimas antioxidantes y disminuir los niveles de glucosa en sangre y el contenido de TAG en suero (García-Cerrillo *et al.*, 2018; Peña-Montes *et al.*, 2019); y la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de tallos y hojas de *E. carlinae* en un modelo inflamación aguda al disminuir de forma dosis dependiente los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α y promoviendo el aumento dosis dependiente de la producción de la citocinas antiinflamatoria IL-10 (Arana-Argáez *et al.*, 2021).

Estas actividades biológicas se le atribuyen a su contenido de metabolitos secundarios extraídos, los cuales incluyen: sesquiterpenos, ácidos grasos saturados, fitoesteroles, polifenoles, saponinas, flavonoides, polioles, terpenos, taninos y terpenoides (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016; Castro-Torres *et al.*, 2017; Knauth *et al.*, 2018; Noriega-Cisneros *et al.*, 2019).

Sin embargo, no existen reportes en la literatura acerca de la actividad antioxidante atribuida al extracto de acetato de etilo ni la actividad antiinflamatoria en un modelo de diabetes experimental lo cual hace que sea de interés su estudio. Por lo tanto, se esperaría que en un extracto de acetato

de etilo debido a su polaridad intermedia sea posible extraer un alto contenido de flavonoides, los cuales además de poseer actividad antioxidante, se han reportado poseer potencial para el tratamiento del HGNA a través de sus efectos sobre el metabolismo y su potencial antiinflamatoria (Van De Wier *et al.*, 2017). Por otro lado, Pereira y cols. (2019) determinaron un gran potencial antioxidante *in vitro* en las inflorescencias en comparación de los demás órganos de *E. maritimum*, mientras que Paşayeva y cols. (2020) reportaron un alto contenido de flavonoides en inflorescencias de *E. kotschy* empleando el acetato de etilo respecto a otros solventes.

1.5.1. JUSTIFICACIÓN

Las especies reactivas de oxígeno derivadas de la acumulación de lípidos conducen a un daño al hígado, resultando en el desarrollo de diversas enfermedades hepáticas debido al incremento de estrés oxidante y al desencadenamiento de una cascada inflamatoria. Este aumento de especies reactivas de oxígeno se ha relacionado con la actividad alterada del sistema antioxidante. Por ello, el estudio del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en hígado de ratas con diabetes experimental generará conocimiento que conlleve a proponer su uso para la prevención de una enfermedad hepática en el tratamiento de la diabetes.

2. HIPÓTESIS

El extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* posee actividad antioxidante y antiinflamatoria en hígado de ratas con diabetes experimental.

3. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* en hígado de ratas con diabetes experimental.

4.1.1. Objetivos específicos

- i. Obtener el extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* y determinar el grupo de metabolitos secundarios mayoritarios.
- ii. Determinar la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae in vitro*.
- iii. Evaluar la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en hígado de ratas con diabetes experimental.
- iv. Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en hígado de ratas con diabetes experimental.
- v. Determinar la actividad hipoglucémica e hipolipidémica del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en suero e hígado de ratas con diabetes experimental.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Identificación y recolección de *Eryngium carlinae*

Las inflorescencias de *Eryngium carlinae* se colectaron en Morelia Michoacán, México (19°38'2" Norte, 101°16'14" Oeste) a una latitud de 2030 msnm, durante el periodo de septiembre-noviembre de 2019.

5.2. Preparación del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

Las inflorescencias de *Eryngium carlinae* se secaron a temperatura ambiente y fueron trituradas hasta obtener fragmentos pequeños. El extracto se obtuvo mediante la maceración con acetato de etilo en relación 1:10 (p/v) durante 10 días en oscuridad a 4 °C. El extracto posteriormente, fue filtrado y concentrado en un rotavapor a 55 ±5 °C. El residuo se disolvió en aceite mineral a 150 mg/mL y almacenado en oscuridad a 4 °C.

5.3. Determinación fitoquímica del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

5.3.1. Ácidos fenólicos totales

Se llevó a cabo la determinación del contenido de ácidos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu (Schwarz *et al.*, 2001). Se tomaron 10 µL de extracto (1 mg/mL) /acetato de etilo (blanco) a una concentración de 1 mg/mL y se mezclaron con 90 µL de agua bidestilada y 750 µL de solución de Folin-Ciocalteu (1:10 con metanol). Las mezclas se agitaron vigorosamente en un vórtex por 5 min, para posteriormente añadir 750 µL de carbonato de sodio al 6%. La solución se mezcló en vórtex por 1 min y se incubaron por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. Los resultados se expresan en µg de ácido gálico por mL de extracto, obtenidos mediante una curva de calibración de ácido gálico como estándar a concentraciones de entre 0 y 1 µmoles mediante la siguiente ecuación $y = 6.1652x - 0.0016$.

5.3.2. Flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales se empleó el método de cloruro de aluminio descrito por Kim *et al.* (2003). Un volumen de 10 µL de extracto (1 mg/mL) /acetato de etilo (blanco) se mezcló con 490 µL de metanol, por 1 min. Posteriormente, se agregaron 1000 µL de metanol, 100 µL de cloruro de aluminio al 10% y 100 µL de acetato de potasio 1 M. Las muestras se agitaron en vórtex por 1 min y se incubaron 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se obtuvieron lecturas de absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. La cuantificación de flavonoides se obtuvo a partir de una curva de calibración con quercetina a concentraciones de entre 0 y 100 µmoles mediante la siguiente ecuación $y = 0.016x - 0.0114$. Expresándose los resultados se en equivalentes de µg de quercetina por mL de extracto.

5.3.3. Terpenoides totales

La determinación de terpenoides totales se llevó a cabo por el método descrito por Ghorai et al. (2012). Se mezclaron 250 µL de extracto (10 mg/mL) con 2.5 mL de cloroformo en vórtex durante 3 min y se colocó en una cama de hielo por 10 min. Posteriormente se agregaron 100 µL de ácido sulfúrico y se reposó durante 2 h en tubos con tapa (no sellados fuertemente) y en oscuridad. Finalmente, se recuperó una fase rojiza y se mezcló con 900 µL de metanol para la obtención de lecturas de absorbancia a 538 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV, empleando como blanco el metanol. La cuantificación de terpenoides se obtuvo a partir de una curva de calibración con linalool a concentraciones de entre 0 y 10 µmoles mediante la siguiente ecuación $y = 0.0261 + 0.0172x$. Expresándose los resultados se en equivalentes de mg de linalool por mL.

5.4. Capacidad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* in vitro

5.4.1. Ensayo de DPPH*

La capacidad captadora de radicales se evaluó empleando al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) (Blois, 1958). En resumen, el extracto (7.5, 15,30 y 60 mg/mL) se agregó a 1 mL de acetato de etilo, posteriormente, se añadió 1 mL de DPPH* 0.2 mM en acetato de etilo y etanol (1:1). La solución fue mezclada e incubada por 30 min en oscuridad. La absorbancia de la mezcla se midió a 517 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS. La actividad secuestradora de DPPH* se expresó como la concentración requerida para inhibir el 50% del DPPH* presente en la solución.

5.4.2. Ensayo FRAP

La actividad antioxidante total se midió mediante el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (Vijayalakshmi y Ruckmani, 2016). El extracto de acetato de etilo a diferentes concentraciones (7.5, 15, 30 y 60 mg/mL) se añadió a 1 mL de agua desionizada, 2.5 mL de un buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.6) y 2.5 mL de una solución de ferrocianuro de potasio al 1%. La solución fue mezclada e incubada a 50 °C por 20 min. Al finalizar, a la incubación se le agregó 1.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugó a 3 000 rpm 10 min. El sobrenadante (2.5 mL) se mezcló con 2.5 mL de agua desionizada y 0.5 mL de cloruro férrico al 0.1%. La absorbancia de la mezcla se midió a 700 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS. La capacidad reductora se expresó como la concentración requerida para reducir el hierro férrico a su forma ferrosa presente en la solución al 50%.

5.5. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* in vivo

5.5.1. Modelo biológico

Se utilizaron ratas macho Wistar (300-350 g) mantenidas en condiciones de temperatura controlada, ciclos de luz/oscuridad de 12 h y con acceso libre de alimento estándar y agua alimentadas. Todo procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones de cuidado y manejo de animales de experimentación expedido por la Secretaría de Agricultura (NOM-062-ZOO-1999).

5.5.1.1. Inducción de diabetes

La inducción de diabetes se realizó con previo ayuno de 14 h, mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (45 mg/kg) disuelto en buffer de citrato 0.1 M (pH 4.5). Los grupos control fueron administrados con buffer de citrato (vehículo). Posterior a los 5 días de administración de la STZ, la glucosa se determinó empleando un glucómetro (Accucheck Performa Roche) para confirmar la hiperglucemia. Las ratas que presentaron niveles de glucemia >300 mg/dL se seleccionaron para formar parte de los grupos diabéticos.

5.5.2. Diseño experimental

Un total de 32 ratas macho Wistar se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n=8) como se menciona a continuación: grupo 1: CN control normoglucémico (citrato, aceite mineral); grupo 2: CD control diabético (STZ, aceite mineral); grupo 3: NEC ratas normoglucémicas (citrato) tratadas con 30 mg/kg de extracto de *E. carlinae*; y el grupo 4: DEC ratas diabéticas (STZ) tratadas con 30 mg/kg de extracto de *E. carlinae*. Los tratamientos con extracto/aceite mineral iniciaron 15 días después de la administración de STZ o citrato. La administración del extracto/aceite mineral se realizó mediante el uso de una sonda oral durante 60 días, ajustando la dosis de acuerdo al peso corporal cada 8 días. Durante el periodo de administración, la concentración de glucosa obtenida a partir de una punción en la vena de la cola de la rata se determinó empleando un glucómetro comercial.

5.5.2.1. Preparación del tejido

Al finalizar los 60 días de tratamiento, las ratas fueron eutanizadas por decapitación para la obtención del hígado y suero.

5.5.2.2. Obtención del suero sanguíneo

Las muestras sanguíneas obtenidas se colocaron en tubos BD Vacutainer® para Suero con activador de coagulación. Dichas muestras se centrifugaron a 5 000 rpm durante 10 min para la obtención del suero para la determinación de parámetros bioquímicos.

5.5.2.3. Aislamiento de mitocondrias

El aislamiento de las mitocondrias de hígado se realizó por centrifugación diferencial, empleando el método modificado descrito por Saavedra-Molina y Devlin (1997). El hígado se colocó en el medio 1 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM y EGTA 1 mM, pH 7.4) a 4 °C. El órgano se homogenizó y se centrifugó (centrífuga Beckman J2-MC) a 2,000 rpm por 10 min a 4 °C para remover restos celulares. Del sobrenadante obtenido se almacenó 1 mL para determinaciones posteriores,

mientras que el restante se centrifugó a 7,500 rpm por 10 min a 4 °C. El precipitado (fracción mitocondrial) se resuspendió en medio 2 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM y MOPS 2 mM, pH 7.4) y 80 µL/mL de albúmina sérica bovina 0.2%, y se centrifugó a 9,000 rpm por 10 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 2 mL de medio 2 y se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su utilización.

5.5.3. Determinación de parámetros bioquímicos

La cuantificación de glucosa, triacilgliceroles, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa (parámetros de función hepática), se determinó en suero empleando un método enzimático y/o colorimétrico.

5.5.4. Cuantificación de triacilgliceroles hepáticos

La determinación de triacilgliceroles en el hígado se llevó a cabo mediante la metodología empleada por Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía (2012) con algunas modificaciones en homogenado de hígado. 20 µg/µl de proteína de homogenado se resuspendieron en una solución de PBS y se le añadieron 25 µl de tritón-X100 al 5%. Las muestras se sometieron a un baño ultrasónico a 60 °C por 5 min y se dejaron atemperar a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13,300 rpm durante 15 min. A partir del sobrenadante obtenido se determinó la concentración de triacilgliceroles de acuerdo al kit de ensayo comercial Spinreact (Sant Esteve de Bas, España).

5.5.5. Actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae in vivo*

5.5.5.1. Determinación de la actividad de la enzima Catalasa

La actividad de la catalasa se determinó midiendo la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno disuelto empleando un electrodo de oxígeno tipo Clark conectado a un monitor biológico de oxígeno (Jeulin *et al.*, 1989). 0.1 mg/mL de proteína de homogenado de hígado se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M y EDTA 5mM (pH 7.6) a 25 °C y se monitoreó por 1 min. Posteriormente, se agregó a la cámara una solución de H₂O₂ 5mM y se monitoreó la conversión de H₂O₂ a O₂ por 3 min.

5.5.5.2. Determinación de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa

La actividad de la SOD se evaluó empleando un kit de análisis comercial (Sigma-Aldrich, kit de determinación 19160 SOD), el cual permite analizar la actividad de la enzima mediante un método colorimétrico. Posterior a la incubación de 0,2 mg de mitocondria de hígado a 37 °C por 20 min, las lecturas se tomaron a 450 nm empleando un lector de micro placa Multiskan Go (Thermo Scientific).

5.5.5.3. Determinación de la Peroxidación de Lípidos

La peroxidación de lípidos se determinó por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) modificado por Peña-Montes de Buege y Aust (1978). Una alícuota de mitocondrias de hígado se resuspendió

en 25 mL de Buffer de fosfatos salino (PBS, pH 7.4), se lavó mediante 2 ciclos de decantación y centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C, y finalmente, el precipitado se resuspendió en 300 µL de PBS. 0.5 mg/mL de mitocondrias lavadas se agregaron a 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.6) y 10 µL de BHT al 10%. A la solución mezclada se le añadió 2 mL de la solución reactiva (TBA 0.375%, TCA 15% y HCl 0.25 M) y se incubó por 30 min en agua a ebullición. Una vez que la solución se atemperó, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 532 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS. Los niveles de peroxidación de lípidos se calcularon basados en la absorbancia y el coeficiente de extinción molar de 156 mM⁻¹cm⁻¹.

5.5.5.4. Determinación de la producción de ERO

La producción de ERO se evaluó empleando la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Se resuspendieron 0.1 mg/mL de mitocondrias de hígado en medio de respiración (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, KH₂PO₄ 3 mM y MgCl₂ 3 mM, pH 7.4) y se incubó con H₂DCFDA 12.5 µM por 15 min en baño de hielo con agitación por 15 min. Después de transferir a la celda se le añadió rotenona 10 µM y se midió la fluorescencia basal por 1 min a una longitud de onda de excitación/emisión de 491/518 en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-5301-PC. Posteriormente, se le añadió succinato 10 mM y se registraron cambios en la fluorescencia por 19 min (Ortiz-Avila *et al.*, 2015).

5.5.5.5. Determinación de la actividad de los Complejos de la CTE

Para evaluar las actividades de los complejos mitocondriales, las mitocondrias se permeabilizaron por ciclos de congelación/descongelación. La actividad del complejo I se evaluó de acuerdo al método descrito por Ortiz-Avila *et al.* (2015). En resumen, 0.05 mg/mL de mitocondrias solubilizadas se resuspendieron en agua desionizada y se incubó por 2 min. Posteriormente, se le añadió 400 µL de buffer de fosfatos 250 mM, 40 µL BSA 10 mg/mL, 10 µL de antimicina A 0.5 mM y 10 µL de KCN 0.2 mM. La mezcla se incubó por 7 min a temperatura ambiente, se le agregó 40 µL de K₃[Fe(CN)₆] 10 mM y se midió la fluorescencia basal por 1 min a longitudes de excitación/emisión de 352/464 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301PC. Posteriormente, 10 µL de β-NADH 10 mM se agregó y se monitoreó el cambio en la fluorescencia por 2 min. El mismo procedimiento se realizó para la actividad no sensible a rotenona agregando 10 µL de rotenona 2 mM posterior a la primera incubación seguido de añadir el BSA. La actividad específica se calculó empleando una curva estándar para el β-NADH.

Para la actividad del complejo II se empleó el método descrito por Cortés-rojo *et al.*, (2009) con ligeras modificaciones. 0.1 mg/mL de mitocondrias solubilizadas se resuspendieron en agua e incubaron por 2 min. Posteriormente, se le añadió 200 µL de buffer de fosfatos 250 mM, 20 µL BSA 10 mg/mL, 20 µL de succinato 0.5 M (pH 7.2), 5 µL de rotenona 2 mM, 5 µL antimicina A 0.5 mM y 5 µL de KCN 0.2 mM. La mezcla se incubó por 3 min a temperatura ambiente; enseguida, se le agregó 10 µL de DCIP 80 µM y se midió la absorbancia basal por 2.5 min a 600 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS. Posteriormente, 5 µL de TTFA 100 mM se agregaron y se monitoreó

el cambio en la absorbancia por 2.5 min. La actividad específica del complejo II se determinó basada en la absorbancia y el coeficiente de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La actividad del segmento II+III se determinó al resuspender 0.1 mg/mL de mitocondrias solubilizadas en agua e incubarse por 2 min. Posteriormente, se le añadió $200 \mu\text{L}$ de buffer de fosfatos 250 mM , $5 \mu\text{L}$ de EDTA 20 mM , $20 \mu\text{L}$ BSA 10 mg/mL , $20 \mu\text{L}$ de succinato 0.5 M (pH 7.2), $5 \mu\text{L}$ de rotenona 2 mM y $5 \mu\text{L}$ de KCN 0.2 mM . La mezcla se incubó por 3 min a temperatura ambiente, después se le agregó $250 \mu\text{g}$ de citocromo c oxidado y se midió la absorbancia basal por 1.5 min a 550 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS. Posteriormente, $5 \mu\text{L}$ de Antimicina A 0.5 mM se agregaron y se monitoreó el cambio en la absorbancia por 3 min. La actividad específica del complejo III se determinó basada en la absorbancia y el coeficiente de extinción molar de $19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cortés-rojo *et al.*, 2009).

Para evaluar la actividad del complejo IV, se resuspendieron 0.1 mg/mL de mitocondrias solubilizadas en agua y se incubaron por 2 min. Posteriormente, se le añadió $200 \mu\text{L}$ de buffer de fosfatos 250 mM , $20 \mu\text{L}$ BSA 10 mg/mL , $5 \mu\text{L}$ de rotenona 2 mM , $5 \mu\text{L}$ de TTFA 100 mM y $5 \mu\text{L}$ de antimicina A 0.5 mM . La mezcla se incubó por 3 min a temperatura ambiente, después se le agregó $125 \mu\text{g}$ de citocromo c reducido y se midió la absorbancia basal por 24 segundos a 550 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS. Posteriormente, $5 \mu\text{L}$ de KCN 0.2 mM se agregaron y se monitoreó el cambio en la absorbancia por 2 min. La actividad específica del complejo IV se determinó basada en la absorbancia y el coeficiente de extinción molar de $19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Peña-Montes *et al.*, 2020).

5.5.6. Actividad antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

5.5.6.1. Determinación de la expresión de marcadores inflamatorios

Los niveles de expresión del factor de transcripción NF- κ B y de las enzimas iNOS y COX-2 se midió a través de inmunodetección. La proteína total del homogenado se determinó mediante el método de Lowry empleando como estándar BSA para la curva de calibración. Un total de $50 \mu\text{g}$ de proteína total del homogenado de hígado se resolvió en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 10% y se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinildieno. Estas membranas se bloquearon con leche al 5% (p/v) en TBS-T (Tris/HCl 10 mM , NaCl 150 mM , pH 7.6; y tween 20 0.05%) por 1 h y a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y agitación constante con el anticuerpo primario anti-NF- κ B (1:400; ab-7971, Abcam, Cambridge, UK), anti-NOS2 (1:200; sc-7271, Santa Cruz), anti-COX2 (1:500; sc-376861; Santa Cruz), anti- β -actina (1:500; sc-47778; Santa Cruz) y anti- β -tubulina (1:200; sc-55529, Santa Cruz). Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente goat anti-rabbit IgG (1:4000; sc-2004, Santa Cruz) y m-IgGk BP (1:1000; sc-516102, Santa Cruz) acoplados a peroxidasa (HRP), durante 2 h o toda la noche en agitación constante y a 20 o $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Las imágenes se obtuvieron mediante quimioluminiscencia empleando el fotodocumentador ChemiDoc XRS + imaging system (Bio-Rad, USA) y se analizaron con el programa

Image Lab. Los niveles de expresión de las proteínas se obtuvieron basadas en la expresión de β -tubulina o β -actina como control de carga.

5.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de 3-4 experimentos independientes. los resultados de los ensayos *in vivo* se expresan como la media \pm error estándar (EE) de una n=6-8 y de una n=3 para los ensayos de inmunodetección. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza ANOVA de una sola vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

6.1. Análisis fitoquímico del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

Las determinaciones fitoquímicas del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* para conocer el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides en las inflorescencias se muestra en la tabla 1. Estas determinaciones muestran que el grupo de MS mayoritarios en el extracto son flavonoides, seguido de terpenoides y en muy bajas concentraciones ácidos fenólicos.

Tabla 1. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*.

Grupo de MS	Extracto de <i>E. carlinae</i>
Ácidos fenólicos	0.0012 ± 0.0001 mg EAG /mL
Flavonoides	4.097 ± 0.0715 mg EQ /mL
Terpenoides	0.8105 ± 0.0224 mg EL /mL

Resultados expresados como la media±DE de 3-4 muestras independientes. EAG: equivalentes de ácido gálico; EQ: equivalentes de quercetina; EL: equivalentes de linalool; MS: metabolitos secundarios.

6.2. Actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* *in vitro*

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*, se determinó a través de la estabilización y reducción de una molécula oxidante. Los ensayos DPPH• y poder reductor muestran la actividad dosis dependiente del extracto. La actividad antiradical del extracto mostró un IC₅₀= 57.97 mg/mL, mientras que la capacidad reductora del extracto reveló un IC₅₀= 30.90 mg/mL (Figura 4).

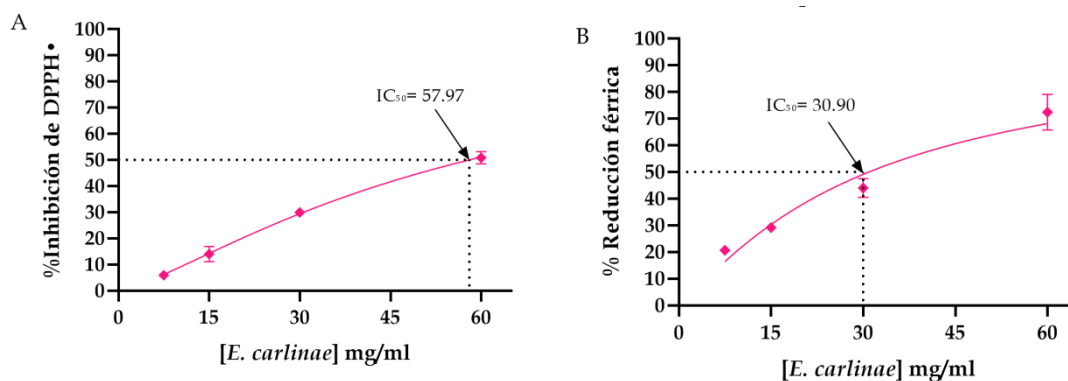


Figura 4. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae*. Resultados expresados como la media±DE de tres experimentos independientes de la inhibición de DPPH• (A) y del poder reductor (B), p<0.05.

6.3. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre los niveles de glucosa y la ganancia de peso *in vivo*

Para determinar la actividad antioxidante del extracto *in vivo* se realizaron ensayos en ratas con y sin diabetes experimental. Para ello, se monitorearon los niveles de glucosa y peso de los 4 grupos experimentales ya que la principal característica de la DM es la hiperglucemia y uno de los síntomas comunes que se experimenta es la pérdida de peso corporal.

Los niveles de glucosa a través de las 8 semanas de tratamiento con el aceite mineral muestran un incremento significativo en el grupo diabético por arriba de los 300 mg/dL, en comparación con el grupo normoglucémico y es mantenido a lo largo del tratamiento. Sin embargo, la administración del extracto a los grupos normoglucémico y diabético no modificó los niveles de glucosa en comparación a los grupos control normoglucémico y diabético respectivamente (Figura 5).

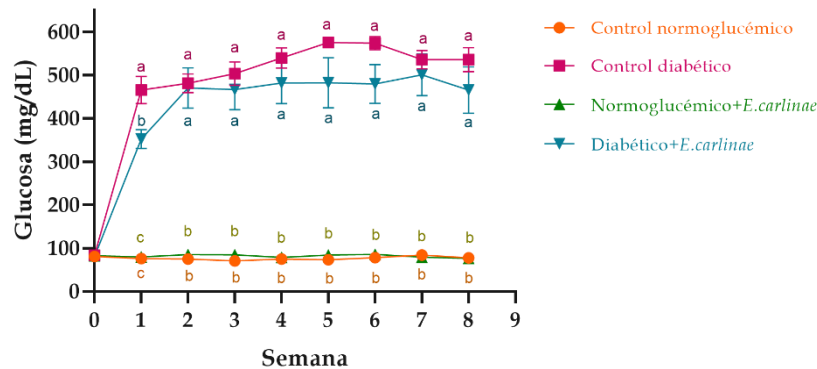


Figura 5. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre los niveles de glucosa. Resultados expresados como la media±EE, n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

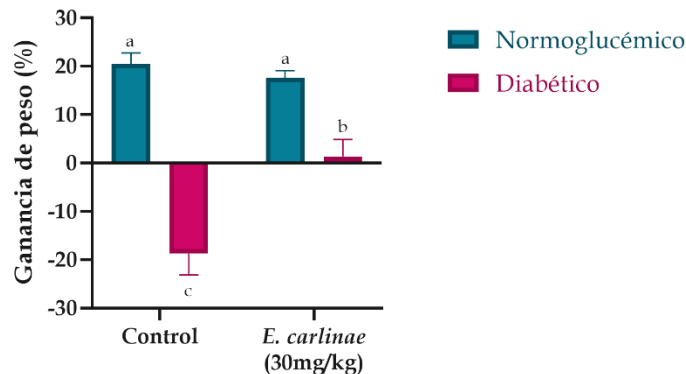


Figura 6. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre el porcentaje de ganancia de peso corporal. Resultados expresados como la media±EE, n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Por otro lado, la ganancia del peso al final del tratamiento para los grupos normoglucémicos fue estadísticamente similar (CN= 20.43 ± 2.34; NEC=17.67 ± 1.44), mientras que para el grupo diabético mostró una disminución significativa (CD=-18.71 ± 4.43), en comparación con el grupo

normoglucémico. En cambio, el grupo diabético administrado con extracto mostró un incremento de peso significativo ($DEC=1.40 \pm 3.48$) en comparación con el grupo diabético, mostrando un efecto protector del extracto frente a la pérdida de peso (Figura 6).

6.4. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre parámetros bioquímicos y de daño hepático

Al final de las 8 semanas de tratamiento, los niveles de glucosa del grupo diabético fueron de 4.6 veces más altos que el grupo normoglucémico. Sin embargo, la administración del extracto no tuvo un efecto significativo en ambos grupos (Tabla 2). Además de la glucosa, las anomalías en el metabolismo de lípidos son características durante la diabetes encontrándose un incremento en el contenido de triacilgliceroles. El grupo diabético incrementó 1.5 veces su contenido de TAG en comparación del grupo normoglucémico; sin embargo, este incremento se normalizó con el tratamiento con extracto.

La medición de los niveles séricos de las enzimas aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina se llevó a cabo para determinar el daño hepático. El incremento en los niveles de estas enzimas en el grupo diabético, en comparación con el grupo normoglucémico es indicativo a un daño hepático, sin embargo, este incremento disminuyó cerca de un 36%, 62% y 88%, respectivamente, con la administración diaria del extracto. Por otro lado, la administración del extracto al grupo normoglucémico, no alteró significativamente los niveles de estas enzimas.

Tabla 2. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre parámetros bioquímicos y perfil hepático.

Grupo	CN	CD	NEC	DEC
Glucosa (mg/dL)	96.556 \pm 4.231 ^b	445.75 \pm 20.385 ^a	96.3 \pm 3.491 ^b	440.988 \pm 18.493 ^a
TAG (mg/dL)	50.875 \pm 3.861 ^{bc}	78.417 \pm 3.355 ^a	40.375 \pm 2.983 ^c	58.125 \pm 3.102 ^b
AST (U/L)	257.625 \pm 25.230 ^c	462.571 \pm 19.895 ^a	201.125 \pm 18.218 ^c	339.750 \pm 17.045 ^b
ALT (U/L)	74.5 \pm 6.039 ^c	223.571 \pm 14.371 ^a	55.75 \pm 2.821 ^c	137.125 \pm 7.988 ^b
FA (U/L)	150.250 \pm 19.118 ^c	2144.625 \pm 91.351 ^a	136.5 \pm 14.891 ^c	1137.143 \pm 109.381 ^b

Resultados expresados como la media \pm EE, n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey. CN: control normoglucémico, CD: control diabético, NEC: normoglucémico+*E. carlinae*, DEC: diabético+ *E. carlinae*, TAG: triacilgliceroles, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa, FA: fosfatasa alcalina.

6.5. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre el contenido de TAG en hígado

Para conocer el efecto del extracto sobre la acumulación de triacilgliceroles en el hígado, se determinó su contenido en homogenado de ratas con y sin diabetes experimental (Figura 7). El contenido de TAG en el grupo diabético se incrementó 2.4 veces más que el grupo normoglucémico, sin embargo, la administración del extracto de *E. carlinae* logró movilizar el contenido de TAG a niveles estadísticamente similares a los de los grupos normoglucémicos.

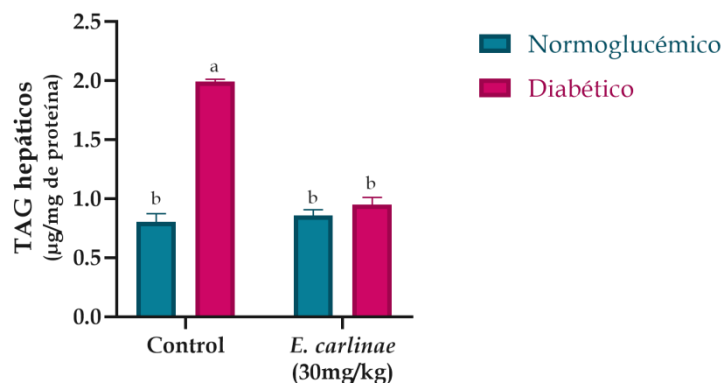


Figura 7. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre el contenido de TAG en hígado. Resultados expresados como la media±EE, n=6. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

6.6. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la producción de ERO mitocondriales

Para conocer si el extracto posee actividad antioxidante a través del secuestro directo de ERO por parte de los metabolitos secundarios presentes, se determinó la producción de ERO en presencia de succinato, un sustrato que alimenta al complejo II (Figura 8). Las ERO en mitocondrias de las ratas del grupo diabético, fueron 2.2 veces más que las del grupo normoglucémico. En cambio, la administración del extracto, inhibió la producción de ERO en el grupo diabético a niveles similares de los grupos normoglucémicos.

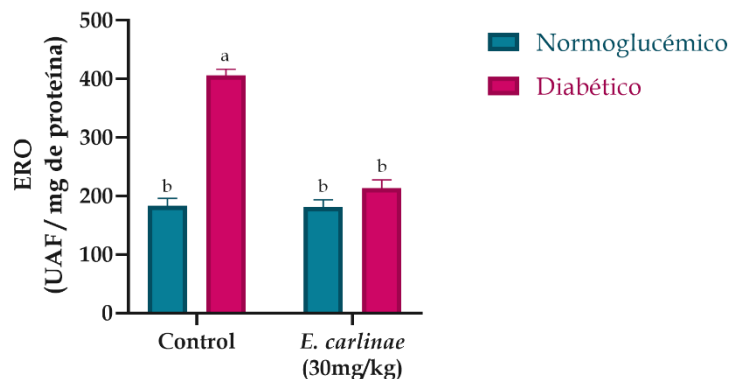


Figura 8. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la producción de ERO. Resultados expresados como la media±EE, n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

6.7. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en la actividad de las enzimas antioxidantes

Para conocer la actividad antioxidante del extracto, se evaluó su efecto sobre la actividad de dos enzimas antioxidantes importantes en la detoxificación de ERO, la catalasa en homogenado y la SOD en mitocondrias de hígado.

Los niveles de la actividad de la catalasa del grupo diabético son significativamente menores que la actividad de la catalasa del normoglucémico (57.958 ± 10.592 y 112.735 ± 15.785 , respectivamente) (Figura 9A). Asimismo, la actividad de la enzima SOD de las ratas diabéticas mostró una disminución significativa de alrededor del 54%, en comparación con la actividad de la enzima de las ratas normoglucémicas (Figura 9B). Este fenómeno se restauró al administrarse el extracto al grupo diabético, el cual tuvo un incremento significativo de 1.6 y 1.8 veces más que el grupo control diabético, respectivamente. Sin embargo, la administración del extracto no modificó la actividad enzimática en las ratas normoglucémicas, en comparación con el control normoglucémico.

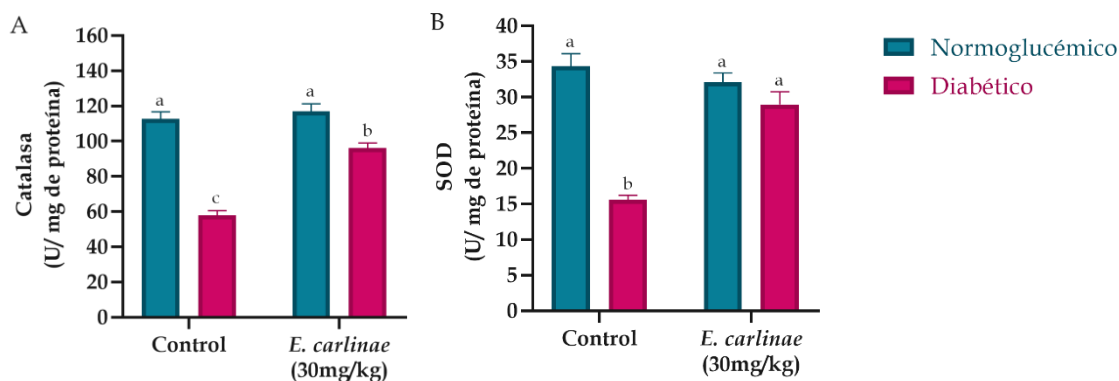


Figura 9. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (A) y SOD mitocondrial (B). Resultados expresados como la media \pm EE, n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

6.8. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de hígado

Para determinar la actividad antioxidante del extracto a través de otro mecanismo de acción como lo es la estabilización de hidroperóxidos lipídicos se evaluaron los niveles de peroxidación de lípidos en mitocondrias de hígado mediante el ensayo de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

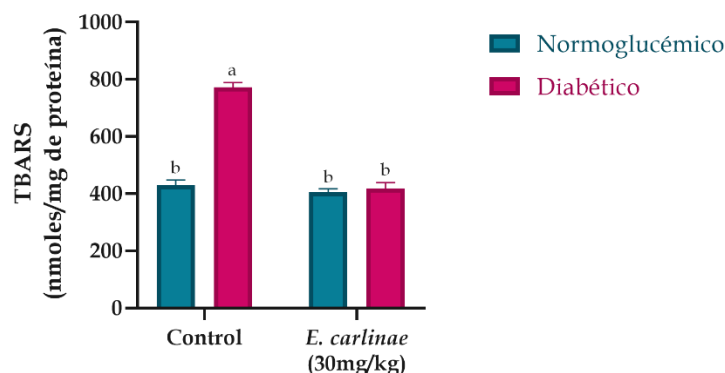


Figura 10. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de hígado. Resultados expresados como la media \pm EE, n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Las mitocondrias del grupo diabético mostraron un incremento significativo en los niveles de sustancias reactivas al TBA, comparado con el grupo normoglucémico, como se ha reportado bajo condiciones de hiperglucemia. Por otro lado, la administración del extracto, no influyó en el aumento en el daño oxidativo a las membranas en el grupo normoglucémico, mientras que, en el grupo diabético con extracto, previno la peroxidación de lípidos mitocondriales (Figura 10).

6.9. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la funcionalidad de la CTE

Para conocer el grado de disfuncionalidad de la CTE y el efecto que posee el extracto sobre los complejos mitocondriales, se llevó a cabo la determinación de la actividad de los mismos (Figura 11). Las ratas del grupo diabético mostraron un incremento significativo en la actividad de los complejos II y III (Figura 11B, 11C), en comparación con las ratas del grupo normoglucémico de alrededor del 70% y 86% respectivamente. Por otro lado, la actividad del complejo I, disminuyó en el grupo diabético cerca del 32% (Figura 11A), en comparación con el grupo normoglucémico. Sin embargo, se previno la disfunción de los complejos con la administración del extracto al grupo diabético (Figura 11A). En cambio, la actividad del complejo IV, no mostró cambios significativos entre los grupos (Figura 11D).

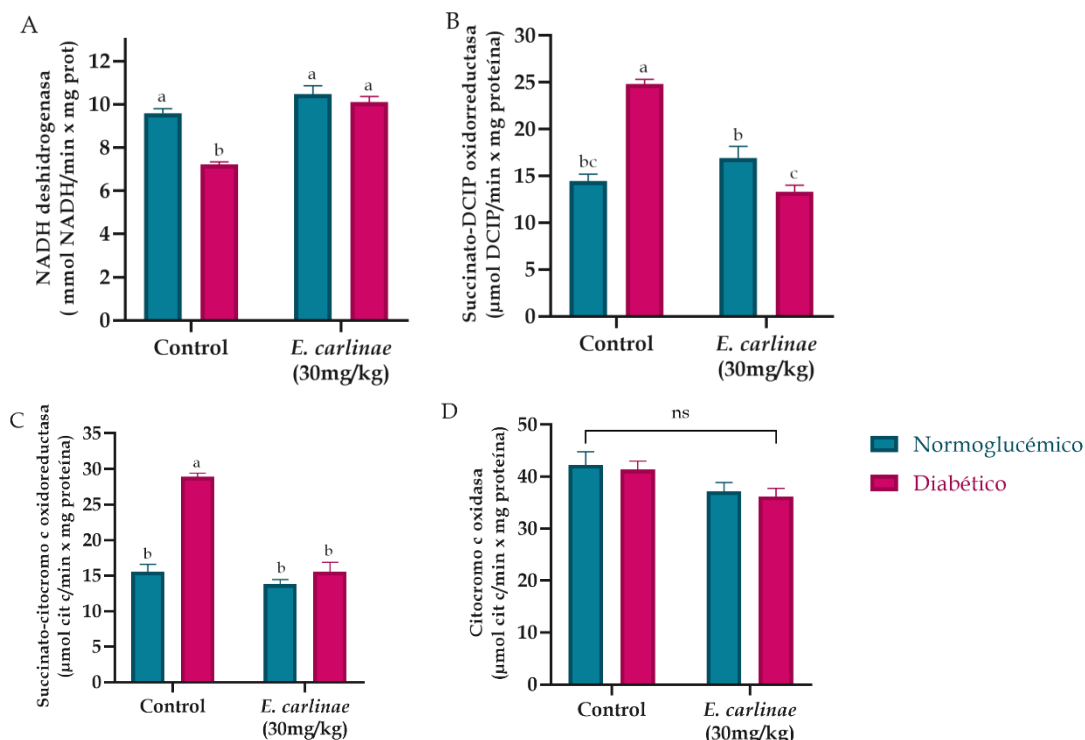


Figura 11. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la actividad de los complejos mitocondriales. Complejo I (A) Complejo II (B), Complejo III (C) y Complejo IV (D). Resultados expresados como la media±EE, n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

6.10. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la respuesta inflamatoria

Para conocer la capacidad antiinflamatoria del extracto, se llevó a cabo la determinación de los niveles de expresión del factor de transcripción de las moléculas proinflamatorias NF- κ B (Figura 12), iNOS (Figura 13) y COX-2 (Figura 14). La expresión del factor de transcripción NF- κ B se muestra \sim 4.4 veces más aumentada en el grupo diabético en comparación con control normoglucémico (Figura 12A, 12B). Mientras que este efecto, se atenuó aproximadamente un 50% al administrarse el extracto durante los 60 días de tratamiento al grupo diabético (Figura 12A, 12B).

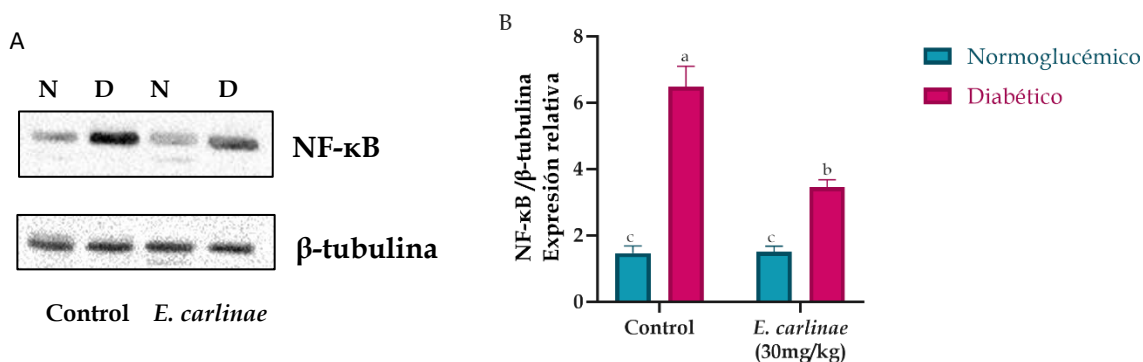


Figura 12. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la expresión del factor de transcripción NF- κ B. Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas NF- κ B y β -tubulina (A). Análisis densitométrico de la relación NF- κ B/ β -tubulina (B). Resultados expresados como la media \pm EE, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey. N: normoglucémico; D: diabético; NF- κ B: factor nuclear κ B.

Por su parte, la expresión de la enzima iNOS en el grupo diabético incrementó alrededor de 3.7 veces en comparación con el grupo normoglucémico (Figura 13A, 13B). Sin embargo, la administración del extracto mitigó el incremento en la expresión de esta enzima a valores estadísticamente similares al del grupo normoglucémico control (Figura 13A, 13B).

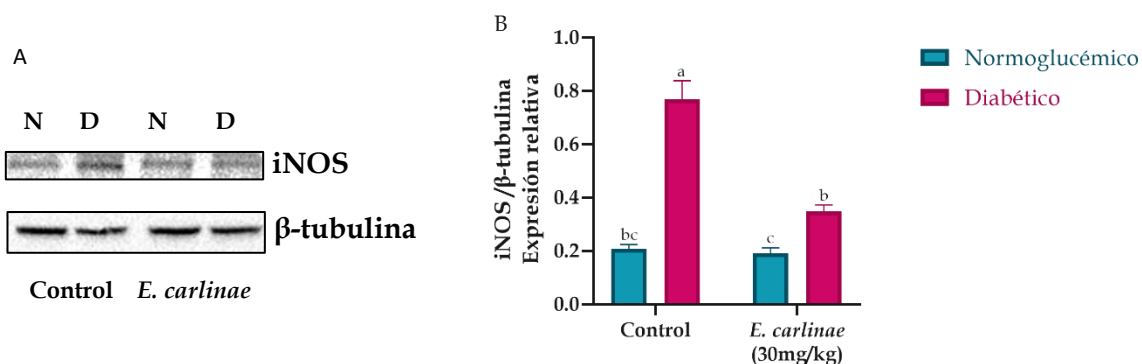


Figura 13. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la expresión de la enzima iNOS. Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas iNOS y β -tubulina (A). Análisis densitométrico de la relación iNOS/ β -tubulina (B). Resultados expresados como la media \pm EE, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey. N: normoglucémico; D: diabético; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

Por otro lado, la expresión de la enzima COX-2 en el grupo diabético se muestra incrementada alrededor de 2.6 veces más que el grupo normoglucémico (Figura 14A, 14B). No obstante, la administración del extracto al grupo diabético no promovió un cambio en significativo en la expresión de esta enzima en comparación con el grupo diabético (Figura 14A, 14B).

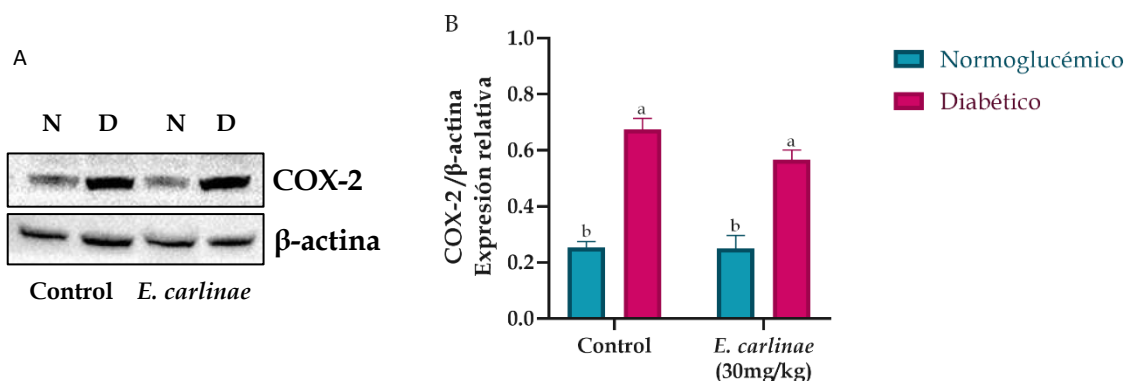


Figura 14. Influencia del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* sobre la expresión de la enzima COX-2. Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas COX-2 y β -actina (A). Análisis densitométrico de la relación COX-2/ β -actina (B). Resultados expresados como la media \pm EE, n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) basados en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey. N: normoglucémico; D: diabético; COX-2: ciclooxigenasa 2.

6. DISCUSIÓN

7. Análisis fitoquímico del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

Con los resultados de diversas investigaciones, se ha demostrado que algunas plantas del género *Eryngium* L. poseen diferentes actividades biológicas. Dentro de ellas, se encuentra la actividad antioxidante y antiinflamatoria (Wang *et al.*, 2012; Sepanlou *et al.*, 2019). Además, este tipo de actividad se ha relacionado con el contenido de MS presentes en la planta, principalmente de polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanos y estilbenos) y carotenoides (xantofilas y carotenos), en el caso de la actividad antioxidante; y de algunos alcaloides, terpenos y compuestos fenólicos (taninos, cumarinas, saponinas y flavonoides, principalmente), debido a que promueven la actividad antiinflamatoria (Xu *et al.*, 2017; Reis Nunes *et al.*, 2020). De forma que el presente estudio, se diseñó para llevar a cabo la investigación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en hígado de ratas diabéticas inducidas con STZ.

Para ello, se determinó que los principales grupos de MS extraídos de las inflorescencias con acetato de etilo son flavonoides (Tabla 1), los cuales se han reportado que poseen actividad antioxidante. Esta actividad se sabe que se debe, al arreglo de sus grupos funcionales, principalmente de los grupos hidroxilo, los cuales llevan a cabo el secuestro de radicales libres o la quelación de iones metálicos. Además, se ha reportado que este grupo de MS poseen capacidad antiinflamatoria inhibiendo la actividad del factor de transcripción NF- κ B y por tanto, la expresión de enzimas inducibles tales como la ciclooxigenasa (COX-2) y óxido nítrico sintasa (iNOS), enzimas que participan en la producción de mediadores inflamatorios (Kumar y Pandey, 2013; Panche *et al.*, 2016; Ginwala *et al.*, 2019).

7.1. Actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* *in vitro*

Existen numerosos ensayos para la determinación del mecanismo por el cual los MS contenidos en un extracto, ejercen su actividad antioxidante, dentro de los cuales se encuentra el ensayo *in vitro* DPPH^{*}, el cual se determinó para evaluar la capacidad de los MS del extracto para donar un átomo de H⁺, ya que previenen o retrasan la producción de radicales libres o terminan con procesos oxidativos (Xu *et al.*, 2017). Con base en los resultados obtenidos en la Figura 4, la concentración requerida del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* para inhibir el 50% de los radicales libres fue de 57.97 mg/mL, la cual al compararla con la actividad anti-DPPH^{*} de un extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *E. maritimum* (IC₅₀=31.19 mg/mL), mostró una menor actividad antioxidante (Matejić *et al.*, 2019). Sin embargo, el potencial del extracto para estabilizar el 50% de los agentes oxidantes, al donar un electrón o bien el poder reductor que posee el extracto, fue de 30.90 mg/mL, concentración similar a la cual se reportó la mayor actividad antioxidante *in vitro* de un extracto hexánico de inflorescencias de *E. carlinae* (%inhibición DPPH^{*}= 92.09 ±0.81) (García-Cerrillo *et al.*, 2018).

7.2. Efecto del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* in vivo

Durante la diabetes, además de la hiperglucemia, un síntoma característico de la enfermedad especialmente en la DM1, es la pérdida de peso, que al no poderse metabolizar los carbohidratos se busca otra fuente de energía, como los lípidos del tejido adiposo o las proteínas del músculo esquelético (Lal, 2016). Resultados provenientes de esta investigación, demostraron que el extracto no posee actividad hipoglucémica (Tabla 2, Figura 5) como se ha reportado para extractos polares de la parte aérea de *E. carlinae* (Noriega-Cisneros *et al.*, 2012, 2019). Esto podría deberse a que el extracto de acetato de etilo no posee el monoterpeneo α -pineno reportado poseer actividad hipoglucémica en ratones diabéticos inducidos con aloxano (Özbek y Yilmaz, 2017). Además, este metabolito se encuentra dentro de los metabolitos secundarios mayoritarios en un extracto hexánico de inflorescencias de *E. carlinae*, el cual, al ser administrado en un modelo de ratas diabéticas inducidas con STZ mostró poseer actividad hipoglucemiante (Peña-Montes *et al.*, 2019). Por otro lado, la administración del extracto de acetato de etilo disminuyó la pérdida de peso, previniendo el daño excesivo causado por la hiperglucemia (Figura 6).

Por otro lado, la deficiencia o resistencia a la insulina promueve un estado de dislipidemia, en la cual, debido a la activación de lipasas (lipoproteína lipasa, lipasa sensible a hormonas y triacilglicerol lipasa), se promueve un aumento en la acumulación de TAG en suero y en hígado, debido a la acumulación de ácidos grasos provenientes del aumento de la lipólisis del tejido adiposo (Alexopoulos *et al.*, 2019). En el presente estudio, las ratas del grupo diabético mostraron un incremento en los niveles de TAG séricos (Tabla 2) y hepáticos (Figura 7), debido a la condición diabética, mientras que la administración del extracto al grupo diabético, mostró una disminución significativa, al mostrar un efecto hipolipidémico en suero y en hígado. El contenido de TAG séricos en el grupo diabético tratadas con el extracto está en concordancia con lo obtenido por Noriega-Cisneros y cols. (2012), quienes demostraron que al administrar un extracto etanólico de *E. carlinae* existe una disminución significativa en el contenido de TAG séricos en comparación con el control diabético. Mientras que el contenido de TAG hepáticos muestran una disminución similar a lo obtenido por Murillo-Villicaña (2020) a través de la administración de un extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera*. Este efecto hipolipidémico podría estar relacionado al contenido de fitoesteroles como el β -sitosterol y el estigmasterol, los cuales se han reportado actuar modulando la lipogénesis de novo y la absorción de lípidos (Feng *et al.*, 2018, 2020). O bien, al contenido de polifenoles como la rutina y luteolina, los cuales mediante la inhibición de la lipogénesis vía disminución del factor de transcripción SREBP-1c, o a través del incremento en la β -oxidación vía PPAR α , se promueve una disminución en la acumulación de TAG en hígado y por tanto es posible que haya una disminución en el transporte de TAG en VLDL a la circulación. O bien como en el caso de la curcumina, un polifenol que actúa disminuyendo la lipólisis en tejido adiposo reduciendo así el flujo de ácidos grasos hacia el hígado (Wu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018; Paşayeva *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que el estrés oxidante derivado de la acumulación de lípidos conduce a una desregulación en la señalización y metabolismo del hígado, lo que predispone el desarrollo de una enfermedad hepática (Højland Ipsen *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020). Con base en lo anterior, se

determinó la actividad del extracto de acetato de etilo de *E. carlinae* sobre los efectos que desencadena la acumulación de lípidos.

Existe evidencia clínica y experimental en la cual, hacen uso de diferentes métodos para el diagnóstico de la HGNA/ EHNA. La medición de los marcadores de daño hepático como ALT, AST y FA, pueden ser tomados en cuenta para un primer diagnóstico de la enfermedad (Aguilera-Méndez, 2018). Las transaminasas son consideradas indicadores de necrosis hepática ya que, al ser enzimas intracelulares en condiciones fisiológicas, no se encuentran en la circulación, por lo que, al encontrarse elevadas, en especial la ALT, es evidencia de daño en la membrana del hepatocito. En cambio, la medición de la FA durante la esteatohepatitis, puede ser considerada como marcador de fibrosis (Fernández Daza *et al.*, 2008; Kocabay *et al.*, 2011; McGill, 2016; Hadizadeh *et al.*, 2017). En este estudio, estos marcadores se encontraron elevados en los grupos diabéticos, en comparación con los normoglucémicos, no obstante, se obtuvieron diferencias significativas entre ellos, siendo aún mayores en el grupo control diabético (Tabla 2); resultados que concuerdan con lo observado por Yazdi y cols. (2019) y Murillo-Villicaña (2020). Este incremento de las enzimas, se correlaciona con los eventos de necrosis y fibrosis que ocurren durante la progresión del HGNA (Wang *et al.*, 2021). Mientras que la disminución de estos marcadores, al administrarse el extracto, podría estar relacionado con el contenido de flavanonas como la naringina, la cual mostró un efecto hepatoprotector al disminuir los niveles de ATL y AST a valores estadísticamente similares a los del control; esto al mitigar los cambios morfológicos y bioquímicos causados por la patología (Rodríguez *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). Por lo tanto, el extracto podría estar brindando protección al hígado, sin embargo, es necesario realizar algún otro estudio como la biopsia de hígado y análisis histopatológico ya que, para determinar la presencia, severidad y el estadio del HGNA se necesita de una técnica más precisa y confiable como lo es la biopsia de hígado (Arab *et al.*, 2018). Esto con la finalidad de conocer en primera instancia el diagnóstico del HGNA/ EHNA en nuestro modelo de DME y posteriormente si la administración del extracto efectivamente posee un efecto hepatoprotector.

7.3. Actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

De acuerdo con la teoría del doble impacto, la acumulación de lípidos conduce a un aumento en la producción de ERO por parte de la mitocondria, en un intento por disminuir la carga de lípidos mediante la β -oxidación (Martín Domínguez *et al.*, 2013; Højland *et al.*, 2018). En concordancia con lo anterior, en el grupo de ratas diabéticas, se observó un incremento en la producción de ERO, en comparación con los grupos normoglucémicos (Figura 8). Este efecto disminuyó con la administración del extracto, lo cual sugiere que los MS presentes, poseen la capacidad de secuestrar y neutralizar ERO generadas en las mitocondrias a través de la donación de un átomo de H^+ o un electrón, como se ha reportado para los flavonoides como la naringenina (Carocho y Ferreira, 2013; Rashmi *et al.*, 2017). Esta tendencia de disminuir alrededor del 50% de la producción de ERO al administrarse un extracto de inflorescencias de *E. carlinae* es similar a lo reportado por Peña-Montes y cols. (2019), a pesar de emplearse diferentes fracciones celulares del hígado.

Al mantenerse la sobrecarga de lípidos, la oxidación es mediada a través de los citocromos y peroxisomas, exacerbándose la producción de ERO, lo cual causa un desbalance entre el sistema antioxidante y las ERO (Højland *et al.*, 2018). En este estudio, el grupo diabético mostró una disminución en la actividad de las enzimas catalasa y SOD mitocondrial (Figura 9), lo cual puede deberse a una modificación postraduccional, como la nitración, s-nitrosilación o glicación (Yamakura y Kawasaki, 2010; Banerjee y Vats, 2014; Begara-Morales *et al.*, 2016). Lo cual concuerda con otros estudios que se han reportado, en los que durante un estado de hiperglucemia y esteatosis, tanto la catalasa como la SOD, mostraron una disminución en sus actividades (Schmatz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, la administración del extracto aumentó significativamente la actividad enzimática en las ratas diabéticas, estos resultados están en concordancia con lo reportado por Schmatz y cols. (2012) y Junejo y cols. (2020), los cuales reportan que al administrar resveratrol y un flavonoide aislado de un extracto de hojas de *T. angustifolia* respectivamente, se restaura la actividad de ambas enzimas antioxidantes a niveles estadísticamente similares al del control. De forma que es posible que los flavonoides presentes podrían estar interactuando con las enzimas, de modo que se incrementa la función antioxidante o bien como en el caso del kaempferol y la naringenina potenciando el sistema antioxidante a través de la vía del factor de transcripción Nrf2 (Nijveldt *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2018; Ooi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020).

Las grandes cantidades de ERO generadas dentro de la mitocondria conducen a la peroxidación lipídica de las membranas, causando la formación de subproductos como el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE), los cuales contribuyen a la disfunción mitocondrial. Esta es una característica importante del HGNA, que compromete la función del hígado a través del daño celular (Højland *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). Los niveles de peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales de las ratas diabéticas administradas con extracto, mostraron una disminución de aproximadamente el doble, respecto de la peroxidación lipídica en las del grupo control diabético (Figura 10). Lo anterior coincide con la disminución de los niveles de TBARS obtenida por Chandramohan y cols. (2015) al administrarse kaempferol a una dosis de 100 mg/kg, misma tendencia reportada por Schmatz y cols. (2012) al emplear resveratrol a una dosis de 20 mg/kg. Esta prevención al daño oxidativo de lípidos por parte del extracto, se correlaciona con la actividad antioxidante de los flavonoides, al ser capaces de reducir al radical hidroxilo (principal oxidante de los lípidos de membrana) directamente a través de la donación de un átomo de H⁺ o bien inhibiendo su formación a través de la quelación de metales como el hierro, terminando así la propagación del daño a esta biomolécula, como el caso de la quercetina (Kumar y Pandey, 2013).

La peroxidación lipídica al causar alteraciones en la membrana mitocondrial, conduce a un mal funcionamiento de la CTE (Paradies *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2020). Estas alteraciones incluyen la oxidación del fosfolípido de membrana cardiolipina, el cual posee un papel muy importante en la estructura y función de proteínas mitocondriales, como en el caso del complejo multiprotéico que conforma al complejo I y III (Petrosillo *et al.*, 2007). Este evento podría estar presente en las mitocondrias de ratas diabéticas, ya que mostraron inhibición en su actividad de alrededor de un 30%, en comparación con el grupo normoglucémico (Figura 11A); además, este resultado se correlaciona con el incremento en la peroxidación de lípidos de membrana, dentro de los cuales

podría estar implicada la cardiolipina. Por otro lado, la administración del extracto al restaurar la actividad del complejo I a valores estadísticamente similares a los grupos normoglucémicos, demuestra que los MS presentes previnieron la oxidación de la cardiolipina, revirtiendo la inhibición en la actividad del complejo I. Además, esta disminución en la actividad del complejo I podría estar relacionada con el aumento en la actividad del complejo II, de forma que compensa la baja transferencia de electrones por parte del complejo I del grupo diabético (Figura 11B), al haber exceso de equivalentes reductores provenientes de la oxidación de los ácidos grasos, ya que éstos se encuentran incrementados en forma de TAG en las ratas diabéticas (Figura 7). Estos resultados de la actividad de ambos complejos en este modelo de diabetes inducido con STZ, concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado por Ortiz-Avila y cols. (2015), en el cual, también en los grupos diabéticos, se encontró una disminución en la actividad del complejo I y un aumento del complejo II. Sin embargo, en este estudio la actividad del complejo II de ratas administradas con *E. carlinae*, restaura la actividad a valores estadísticamente similares a los del grupo normoglucémico; hecho que se correlaciona con la disminución en la acumulación de TAG hepáticos (Figura 7) y a la restauración en la actividad del complejo I (Figura 11A).

En cuanto a la actividad del complejo III (Figura 11C), ésta también se encuentra incrementada en el grupo diabético, lo cual no está en concordancia con otros reportes en la literatura en los que su actividad se encuentra inhibida por la oxidación de la cardiolipina (Bouderba *et al.*, 2012; Paradies *et al.*, 2014). Este incremento podría estar relacionado con la duración de la diabetes inducida con STZ, ya que se ha reportado que en cerebro, la actividad del complejo III se encuentra elevada a las 4 semanas, pero disminuye después de 9 semanas de inducción (Moreira *et al.*, 2004). En este estudio, a las 8 semanas posterior a la inducción, se encontró elevada la actividad del complejo III, y quizás, si se hubiera prolongado el tiempo del tratamiento, se podría haber observado una disminución en su actividad. Además, este incremento en la actividad del complejo III, está correlacionado con el aumento en la producción de ERO, ya que en un ensayo realizado para la determinación de ERO energizando el complejo I, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a pesar de que se muestra una tendencia a un incremento por parte del grupo diabético (datos no mostrados), mientras que al suministrar un sustrato para el complejo II e inhibiendo el complejo I, se mostró un incremento significativo en la producción de ERO en los grupos diabéticos (Figura 8). Esta producción de ERO a través del complejo III, concuerda con lo reportado en la literatura, en el que se demuestra que a través del ciclo Q, en el sitio Q_o, se lleva a cabo la producción de superóxido durante la bifurcación del transporte de los electrones, debido a la gran poza de coenzima Q altamente reducida (Lanciano *et al.*, 2013). No obstante, la administración del extracto previno esta sobreactividad a valores estadísticamente similares a los grupos normoglucémicos, probablemente, por la disminución en los equivalentes reductores provenientes de la β -oxidación, lo cual se relaciona con el bajo contenido de TAG hepáticos en el grupo diabético administrado con extracto de *E. carlinae* (Figura 7). En cambio, la actividad del complejo IV, no se encuentra alterada en el grupo diabético, lo cual coincide con lo reportado por Ortiz-Avila y cols. (2015) en un modelo de diabetes y por Chen y cols. (2020) en un modelo de esteatosis, en el que la actividad de este complejo no mostró cambios significativos.

7.4 Actividad antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*

La acumulación de lípidos y el aumento en el estrés oxidante inducen inflamación, la cual además de la disfunción mitocondrial, es otra de las principales características del HGNA (Højland *et al.*, 2018). La respuesta inflamatoria en los hepatocitos inicia con la activación del factor de transcripción NF- κ B (heterodímero p50:RelA), el cual a través de la vía de activación canónica al ser liberado por la fosforilación de su inhibidor I κ β , es translocado hacia el núcleo donde se une al ADN y se promueve la transcripción de citocinas proinflamatorias y de las enzimas inducibles iNOS y COX-2 (Sun y Karin, 2008; Alisi *et al.*, 2017; Arroyave-Ospina *et al.*, 2021). Con base en lo anterior, en este estudio se observó un aumento en la expresión de NF- κ B en el grupo diabético (Figura 12) en comparación con los grupos normoglucémicos. Mientras que la administración del extracto, disminuyó este efecto. Este resultado podría estar relacionado con el mecanismo de acción de los flavonoides como lo reportado para la naringina por Rodríguez y cols. (2018), un flavonoide que al ser administrado a una dosis de 40 mg/kg, mostró la disminución de este factor de transcripción a través del secuestro de ERO, las cuales se ha demostrado, activan esta vía. Otro mecanismo por el cual los flavonoides contenidos en el extracto podrían actuar, es mediante la disminución en la degradación del inhibidor I κ B α modulando a las cinasas I κ k, como en el caso de la quercetina y el kaempferol (González-Gallego *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2019). Sin embargo, los resultados de este estudio está en concordancia con lo reportado por Ayyasamy y cols. (2019), ya que la administración del extracto de *E. carlinae* o en este caso del monoterpeno mirtenal (80 mg/kg) disminuyó la expresión de este factor de transcripción en comparación con el grupo diabético control pero no son similares al grupo normoglucémico.

La isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) a diferencia de las isoformas constitutivas (eNOS y nNOS) es capaz de producir una gran cantidad de NO \cdot a partir de L-arginina; además a través de diferentes estímulos, como las ERO o las citocinas TNF- α e IL-1 β , pueden incrementar la expresión de iNOS no solo en las CK, sino que también en los hepatocitos y CEH (Muriel, 2000). Reportes en la literatura demuestran que el incremento en la expresión/actividad de la iNOS posee un papel importante en diferentes condiciones patológicas como en la DM y el HGNA (Madar *et al.*, 2005; Lima-Cabello *et al.*, 2011; Hammoutene y Rautou, 2019; Oltulu *et al.*, 2019). Lo cual concuerda con los datos obtenidos en el presente estudio (Figura 13), en el que el grupo diabético muestra un incremento en los niveles de expresión de la proteína iNOS, debida posiblemente al incremento en las ERO (Figura 8) y se correlaciona con el incremento en los niveles de expresión de NF- κ B (Figura 12), el cual promueve la expresión de iNOS en respuesta de las ERO. Además, este resultado se relaciona con la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes (Figura 9), ya que el NO \cdot derivado de la iNOS además de participar en diferentes funciones fisiológicas en el hígado, conduce a la nitración y s-nitrosilación de diferentes proteínas como la SOD y catalasa (Iwakiri y Young Kim, 2015). Por su parte la administración del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* al grupo diabético disminuyó los niveles de expresión de la iNOS a valores estadísticamente similares al del control normoglucémico (Figura 13), como lo reportado por Rodríguez y cols. (2018), en el que la administración de naringina disminuye la

expresión de iNOS así como la producción de NO \cdot a través de la disminución del factor de transcripción NF- κ B. Este hecho se podría ver reforzado con lo reportado por Ziamajidi y cols. (2018), en el que la suplementación de un extracto de *Allium sativum* disminuyó la expresión del ARNm de iNOS.

Por otro lado, la isoforma inducible de la ciclooxigenasa COX-2 participa en la síntesis de prostanoídes a partir del ácido araquidónico como las prostaglandinas, en respuesta a factores de crecimiento o moléculas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 o TNF- α , bajo condiciones de inflamación tanto aguda como crónica, principalmente en las CK y CEH en el hígado (Hu, 2003; Minghetti, 2004; Martín-Sanz *et al.*, 2017). Existen reportes en la literatura que demuestran que existe un incremento en la actividad y expresión tanto de RNAm como de proteína en diferentes modelos de diabetes experimental (Peng *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2018; Khanaki *et al.*, 2019; Lee y Lim, 2019). Resultados provenientes de esta investigación muestran un incremento en la expresión de la COX-2 en el grupo diabético en comparación con el grupo normoglucémico (Figura 14), lo cual concuerda con lo reportado por Rodríguez y cols. (2018). Además se correlaciona con el incremento en los niveles de expresión de NF- κ B (Figura 12), el cual promueve además la expresión de COX-2 en respuesta de las citocinas proinflamatorias derivadas de las CK. Sin embargo, la administración del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* al grupo diabético no logró disminuir los niveles de expresión de la COX-2, mostrándose así estadísticamente similar al grupo diabético (Figura 14), lo cual podría estar relacionado con la disminución en los niveles de expresión de NF- κ B (Figura 12) en el grupo diabético administrado con extracto, la cual no es significativamente similar a los grupos normoglucémicos. Además, este efecto podría estar relacionado a que el extracto de acetato de etilo de *E. carlinae* no posea MS tales como la berberina (alcaloide), el galato de epigalocatequina (flavonoide hidrofílico esterificado), el ácido clorogénico (ácido fenólico), a los cuales se le han atribuido actividad antiinflamatoria al disminuir los niveles de expresión de RNAm de la COX-2 en un cultivo celular de macrófagos murinos; o antocianinas, las cuales disminuyeron los niveles de expresión de RNAm y de la proteína COX-2 en homogenado de hígado en un modelo de fibrosis hepática a través de la inhibición en la activación o translocación del factor de transcripción NF- κ B (Hwang *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019).

8. RESUMEN DE RESULTADOS

El extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* posee actividad antioxidante dosis dependiente *in vitro* e *in vivo*, ya que mostró poseer capacidad antioxidante a una dosis de 30 mg/kg. La actividad antioxidante del extracto se promovió a través de la disminución los marcadores de estrés oxidante al inhibir la producción de ERO, disminuir la peroxidación de lípidos y al restaurar la actividad de los complejos mitocondriales; así como de promover el sistema antioxidante al restaurar las enzimas antioxidantes CAT y SOD mitocondrial. Además, posee actividad antiinflamatoria al disminuir la expresión del factor de transcripción NF-κB y de la enzima inducible iNOS. Por otro lado, se le atribuye que posee actividad hipolipidémica en suero e hígado de ratas con diabetes experimental al disminuir los niveles de TAG. También se le puede atribuir un posible efecto hepatoprotector, ya que se disminuye un daño en el hígado, observado por la disminución de los marcadores de daño hepático en suero.

Por lo tanto, los resultados obtenidos acerca del uso del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae* en un modelo biológico, contribuyen al conocimiento de los MS presentes en esta especie y del efecto que estos poseen en hígado de un modelo de diabetes experimental. Con lo cual, se propone el modelo de interacción hipotético del extracto de acetato de etilo de *E. carlinae* que muestra en la Figura 15, que pudiera ser empleado en el tratamiento del HGNA durante la DM.

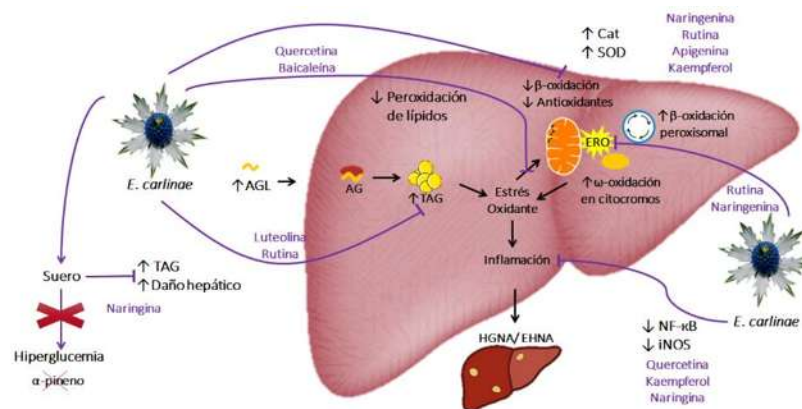


Figura 15. Modelo de interacción hipotético del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *E. carlinae*. AG: ácidos grasos, AGL: ácidos grasos libres; CAT: catalasa; ERO: especies reactivas de oxígeno; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; HGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólico; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; NF-κB: factor nuclear κB; SOD: superóxido dismutasa mitocondrial; TAG: triacilglicérols.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados de la presente investigación demuestran que el extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* posee actividad antioxidante y antiinflamatoria en hígado de ratas con diabetes experimental.

10. REFERENCIAS

- Abbasi Oshaghi, E. (2017). Glucagon like Peptide-1(GLP-1) a Novel Therapeutic Strategy in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 5(2), 54–59. <https://doi.org/10.15171/ajmb.2017.10>
- Adams, L. A., Anstee, Q. M., Tilg, H., y Targher, G. (2017). Non-Alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut*, 66(6), 1138–1153. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313884>
- Aguilera-Méndez, A. (2018). Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(6), 544–549.
- Aguilera-Méndez, A., y Fernández-Mejía, C. (2012). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *BioFactors*, 38(5), 387–394. <https://doi.org/10.1002/biof.1034>
- Al Nahdi, A. M. T., John, A., y Raza, H. (2017). Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β -Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/7054272>
- Alexopoulos, A.-S., Qamar, A., Hutchins, K., Crowley, M. J., Batch, B. C., y Guyton, J. R. (2019). Triglycerides: Emerging Targets in Diabetes Care? Review of Moderate Hypertriglyceridemia in Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 19(4), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1136-3>. Triglycerides
- Alisi, A., Carpino, G., Oliveira, F. L., Panera, N., Nobili, V., y Gaudio, E. (2017). The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–15.
- Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Arab, J. P., Barrera, F., y Arrese, M. (2018). The evolving role of liver biopsy in non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 17(6), 899–902. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7188>
- Arana-Argáez, V., Alonso-castro, A. J., Yáñez-Barrientos, E., Euan-canto, A., Torres-Romero, J. C., Isiordia-Espinoza, M. A., Brennan-Bourdon, L. M., Juárez-Vázquez, M. del C., y González-Ibarra, A. A. (2021). In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of an ethanol extract from the aerial parts of *Eryngium carlinae* F. Delaroché (Apiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113406>
- Arias, I. M., Alter, H. J., Boyer, J. L., Cohen, D. E., y Shafritz, D. A. (2020). *The Liver: Biology and Pathobiology* (I. M. Arias, H. J. Alter, J. L. Boyer, D. E. Cohen, y D. A. Shafritz (eds.); 6a ed.). WILEY Blackwell. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(51\)91244-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(51)91244-5)
- Arroyave-Ospina, J. C., Wu, Z., Geng, Y., y Moshage, H. (2021). Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease : Implications for Prevention and Therapy.

Antioxidants, 10(174), 1–24.

- Ayyasamy, R., Leelavinothan, P., Manigandan, V., y Shankar, M. (2019). Myrtenal attenuates oxidative stress and inflammation in a rat model of streptozotocin- induced diabetes. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1670212>
- Banerjee, M., y Vats, P. (2014). Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biology*, 2(1), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.001>
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., Padilla, M. N., Corpas, F. J., y Barroso, J. B. (2016). Antioxidant Systems are Regulated by Nitric Oxide-Mediated Post-translational Modifications (NO-PTMs). *Frontiers in Plant Science*, 7(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00152>
- Bello-Gonzalez, M. A. (2006). Catálogo de plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. En CIRPAC y INIFAP (Eds.), *Libro técnico* (Número 4).
- Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M. S., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M. A., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J. A., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M. F., Kershenovich-Stalnikowitz, D., ... Velarde- Ruíz Valazco, J. A. (2019). The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(1), 69–99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>
- Bernal-Reyes, R., Sáenz-Labra, A., y Bernardo-Escudero, R. (2000). Prevalence of non-alcoholic steatohepatitis. Comparative study with diabetic patients. *Revista de gastroenterología de México*, 65(2), 58–62. <http://europepmc.org/abstract/MED/11464594>
- Bhardwaj, S., Verma, R., y Gupta, J. (2018). Challenges and future prospects of herbal medicine. *International Research in Medical and Health Science*, 1(1), 3–6. <https://doi.org/10.36437/irmhs.2018.1.1.d>
- Bhatla, S. C., y Lal, M. A. (2018). Plant Physiology, Development and Metabolism. En *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Bhatt, H. B., y Smith, R. J. (2015). Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 4(2), 101–108. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.03>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., y Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blois, M. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bouderba, S., Sanz, M. N., Sánchez-Martín, C., El-Mir, M. Y., Villanueva, G. R., Daille, D., y Koceir,

- E. A. (2012). Hepatic mitochondrial alterations and increased oxidative stress in nutritional diabetes-prone *Psammomys obesus* model. *Experimental Diabetes Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/430176>
- Buege, J. A., y Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>
- Cade, W. T. (2008). Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Physical Therapy*, 88(11), 1322–1335. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080008>
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R., y Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9(3), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- Carocho, M., y Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Castro-Torres, I. G., De La O-Arciniega, M., Naranjo-Rodríguez, E. B., Castro-Torres, V. A., Domínguez-Ortiz, M. Á., y Martínez-Vázquez, M. (2017). The Hypocholesterolemic Effects of *Eryngium carlinae* F. Delaroche Are Mediated by the Involvement of the Intestinal Transporters ABCG5 and ABCG8. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/3176232>
- Cha, J., Kim, D., y Chun, K. (2018). The role of hepatic macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 133–139.
- Chandramohan, G., Al-numair, K. S., Veeramani, C., y Alsaif, M. A. (2015). Protective effect of kaempferol, a flavonoid compound, on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Progress in Nutrition*, 17(3), 238–244. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.982301>
- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., y Li, H. (2020). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 152(March), 116–141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
- Cheng, C., Li, Z., Zhao, X., Liao, C., Quan, J., Bode, A. M., Cao, Y., y Luo, X. (2020). Natural alkaloid and polyphenol compounds targeting lipid metabolism: Treatment implications in metabolic diseases. En *European Journal of Pharmacology* (Vol. 870, Número January, p. 172922). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172922>
- Cortés-rojo, C., Calderón-cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-villagómez, M., Manzo-avalos, S., Mejía-Zepeda, R., Bolgogh, I., y Saavedra-Molina, A. (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9200-3>.Elucidation
- Day, C. P., y James, O. F. W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology*, 114(4),

842–845. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)

DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., y Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(July), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>

Đuračková, Z. (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. *Mitochondrial Medicine*, 19–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6714-3_2

Eggleton, J. S., y Jialal, I. (2020). *thiazolidinediones*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551656/>

Erdem, S. A., Nabavi, S. F., Orhan, I. E., Daglia, M., Izadi, M., y Nabavi, S. M. (2015). Blessings in disguise: A review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0136-3>

Escobedo López, B. L. (2018). PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO 2018 Enfermedades No Transmisibles OBSERVATORIO MEXICANO DE ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES (OMENT). *Secretaria de Salud*. http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/pano-OMENT/Panorama_OMENT_2018.pdf

Feng, S., Belwal, T., Li, L., Limwachiranon, J., Liu, X., y Luo, Z. (2020). Phytosterols and their derivatives: Potential health-promoting uses against lipid metabolism and associated diseases, mechanism, and safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1243–1267. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12560>

Feng, S., Dai, Z., Liu, A. B., Huang, J., Narsipur, N., Guo, G., Kong, B., Reuhl, K., Lu, W., Luo, Z., y Yang, C. S. (2018). Intake of stigmasterol and β -sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(10), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.004>

Fernández Daza, E., Fernández Juan, E., Moreno Mejía, I., y Moreno Mejía, M. (2008). Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & Laboratorio*, 14(11–12), 533–546.

Forbes, J. M., y Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137–188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>

Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., y Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122(6), 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>

García-Cerrillo, D., Noriega-Cisneros, R., Peña-Montes, D., Huerta-Cervantes, M., Rí-os-Silva, M., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., y Saavedra-Molina, A. (2018). Antioxidant Effects of *Eryngium carlinae* in Diabetic Rats. *Asian Journal of Applied Sciences*, 6(5), 308–314. <https://doi.org/10.24203/ajas.v6i5.5482>

García-Ruiz, I. (2015). Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado

- de Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana*, 118(103), 65.
<https://doi.org/10.21829/abm103.2013.51>
- Gastaldelli, A., y Cusi, K. (2019). From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options. *JHEP Reports*, 1(4), 312–328.
<https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.07.002>
- Geraldes, P., y King, G. L. (2010). Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. *Circulation Research*, 106(8), 1319–1331.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.Activation>
- Ghorai, N., Chakraborty, S., Gucchait, S., Saha, S., y Biswas, S. (2012). Estimation of total Terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*, 5(10), 1038. <https://doi.org/10.1038/protex.2012.055>
- Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., y Khan, Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*, 8(2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>
- Giri, B., Dey, S., Das, T., Sarkar, M., Banerjee, J., y Dash, S. K. (2018). Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(July), 306–328.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.157>
- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., y Tuñón, M. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, 22(3).
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J. F., Siddiqui, K. S., Hernández-Sotomayor, S. M. T., y Faisal, M. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/genes9060309>
- Guyton, A. C., y Hall, J. E. (2011). *Textbook of Medical Physiology* (12a ed.). Saunders/Elsevier.
- Hadizadeh, F., Faghihimani, E., y Adibi, P. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(2), 11.
<https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.11>
- Hammoutene, A., y Rautou, P. E. (2019). Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 70(6), 1278–1291.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.012>
- Højland Ipsen, D., Lykkesfeldt, J., y Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Hu, K. Q. (2003). Cyclooxygenase 2 (COX2)-prostanoid pathway and liver diseases. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 69(5), 329–337.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.07.001>

- Hwang, Y. P., Choi, J. H., Yun, H. J., Han, E. H., Kim, H. G., Kim, J. Y., Park, B. H., Khanal, T., Choi, J. M., Chung, Y. C., y Jeong, H. G. (2011). Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.002>
- INEGI. (2019). *Características de las defunciones registradas en México durante 2018*. 1–65. <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2018). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. *Secretaría de Salud*, 1–47. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas - 2019. En B. Malanda, S. Karuranga, P. Saeedi, y P. Salpea (Eds.), *International Diabetes Federation* (9a ed.). <https://doi.org/10.1289/image.ehp.v119.i03>
- Iwakiri, Y., y Young Kim, M. (2015). Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci.*, 36(8), 524–536. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.05.001>.NITRIC
- Jain, C., Khatana, S., y Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(2), 494–504. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(2\).494-04](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).494-04)
- Jebur, A., Mokhamer, M., y El-Demerdash, F. (2016). A Review on Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Diabetes Mellitus. *Austin Endocrinology and Diabetes Case Reports*, 1(1), 1006.
- Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Laval-Martin, D., y Calvayrac, R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*, 24(2), 185–196. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240206>
- Jiang, J., Yan, L., Shi, Z., Wang, L., Shan, L., y Efferth, T. (2019). Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of Citrus changshan-huyou) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF-κB and MAPKs. *Phytomedicine*, 64(August), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153082>
- Jiang, S., Young, J. L., Wang, K., Qian, Y., y Cai, L. (2020). Diabetic-induced alterations in hepatic glucose and lipid metabolism: The role of type 1 and type 2 diabetes mellitus (Review). *Molecular Medicine Reports*, 22(2), 603–611. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11175>
- Junejo, J. A., Zaman, K., Ali, M., y Rudrapal, M. (2020). New flavonoid with antidiabetic and antioxidant potential from tetrastigma angustifolia (Roxb.) deb leaves. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, 1–15. <https://doi.org/10.1590/S2175-97902019000418806>
- Karamanou, M., Protogerou, A., Tsoucalas, G., Androutsos, G., y Poulakou-Rebelakou, E. (2016). Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World Journal of Diabetes*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i1.1>

- Karim, S., Adams, D. H., y Lalor, P. F. (2012). Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal of Gastroenterology*, 18(46), 6771–6781. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i46.6771>
- Kashanian, S., y Fuchs, M. (2015). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Diabetes Mellitus: A Clinician's Perspective. *International Journal of Digestive Diseases*, 01(01), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2472-1891.100010>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., y Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Keenan, J. M. (2018). The Role of Niacin in the Management of Dyslipidemia. En *Dyslipidemia*.
- Khanaki, K., Abedinzade, M., y Hamidi, M. (2019). The effects of urtica dioica and lamium album extracts on the expression level of cyclooxygenase-2 and caspase-3 in the liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Sciences*, 25(1), 37–43. <https://doi.org/10.15171/PS.2019.6>
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., y Quinn, M. T. (2007). Improved Quantitative Structure-Activity Relationship Models to Predict Antioxidant Activity of Flavonoids in Chemical, Enzymatic, and Cellular Systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749–1770.
- Kikowska, M., Dworacka, M., Kędziora, I., y Thiem, B. (2016). Eryngium creticum – Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological activity. A review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(3), 392–399. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.008>
- Kim, D., Jeong, S. W., y Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321–326.
- Kim, K. S., Lee, B. W., Kim, Y. J., Lee, D. H., Cha, B. S., y Park, C. Y. (2019). Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes: Part II: Treatment. *Diabetes and Metabolism Journal*, 43(2), 127–143. <https://doi.org/10.4093/dmj.2019.0034>
- Knauth, P., Acevedo-Hernández, G. J., Cano, M. E., Gutiérrez-Lomelí, M., y López, Z. (2018). In Vitro Bioactivity of Methanolic Extracts from Amphipterygium adstringens (Schltld.) Schiede ex Standl., Chenopodium ambrosioides L., Cirsium mexicanum DC., Eryngium carlinae F. Delaroché, and Pithecellobium dulce (Roxb.) Benth. Used in Traditional Medi. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/3610364>
- Kocabay, G., Telci, A., Tutuncu, Y., Tiryaki, B., Ozel, S., Cevikbas, U., Okten, A., y Satman, I. (2011). Alkaline phosphatase: can it be considered as an indicator of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis with type 2 diabetes? *Bratislavske Lekarske Listy*, 112(11), 626–629.
- Kumar, S., y Pandey, A. k. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1w0ddx8.35>
- Kurmukov, A. G. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan*, 1(6), 13–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3912-7_4

- Lal, S. B. (2016). Diabetes : Causes , Symptoms and Treatments. En *Public Health Environment and Social Issues in India: Vol. Chapter 5* (Número January, pp. 55–67).
- Lammert, E., y Zeeb, M. (2014). Metabolism of Human Diseases Organ physiology and pathophysiology. En E. Lammert y M. Zeeb (Eds.), *Metabolism of Human Diseases*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0715-7>
- Lanciano, P., Khalfaoui-hassani, B., Selamoglu, N., Ghelli, A., Rugolo, M., y Daldal, F. (2013). Molecular mechanisms of superoxide production by complex III : A bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827, 1332–1339. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.03.009>
- Law, K. P., y Zhang, H. (2017). The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: Deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China. *Clinica Chimica Acta*, 468(2016), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.02.008>
- Leavens, K. F., y Birnbaum, M. J. (2011). Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(3), 200–215. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.562481>
- Lee, M., Shin, E., Bae, J., Cho, Y., Lee, J. Y., Lee, Y. ho, Lee, B. W., Kang, E. S., y Cha, B. S. (2020). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor protects against non-alcoholic steatohepatitis in mice by targeting TRAIL receptor-mediated lipoapoptosis via modulating hepatic dipeptidyl peptidase-4 expression. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75288-y>
- Li, C. L., Tan, L. H., Wang, Y. F., Luo, C. D., Chen, H. Bin, Lu, Q., Li, Y. C., Yang, X. B., Chen, J. N., Liu, Y. H., Xie, J. H., y Su, Z. R. (2019). Comparison of anti-inflammatory effects of berberine, and its natural oxidative and reduced derivatives from *Rhizoma Coptidis* in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, 52(April 2018), 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.228>
- Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Cheung, F., Hong, M., y Feng, Y. (2018). The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2018/8394818>
- Lima-Cabello, E., García-Mediavilla, M. V., Miquilena-Colina, M. E., Vargas-Castrillón, J., Lozano-Rodríguez, T., Fernández-Bermejo, M., Olcoz, J. L., González-Gallego, J., García-Monzón, C., y Sánchez-Campos, S. (2011). Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *Clinical Science*, 120(6), 239–250. <https://doi.org/10.1042/CS20100387>
- Madar, Z., Kalet-Litman, S., y Stark, A. H. (2005). Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. *Pharmacology*, 73(2), 106–112. <https://doi.org/10.1159/000081952>
- Manna, P., Das, J., Ghosh, J., y Sil, P. C. (2010). Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IκBα/NF-κB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(11), 1465–1484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.025>
- Martín Domínguez, V., Gonzálezs Casas, R., Mendoza Jiménez-Ridruejo, J., García Buey, L., y

- Moreno-Otero, R. (2013). Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 105(7), 409–420. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082013000700006>
- Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Krivošej, Z. D., Zlatković, B. K., Marin, P. D., y Džamić, A. M. (2019). Biological Activity of Extracts and Essential Oils of Two Eryngium (Apiaceae) Species From the Balkan Peninsula. *Acta Medica Medianae*, 58(3), 24–31. <https://doi.org/10.5633/amm.2019.0304>
- McGill, M. R. (2016). The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI Journal*, 15, 817–828. <https://doi.org/10.17179/excli2016-800>
- Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(9), 901–910. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.9.901>
- Mohamed, J., Nazratun Nafizah, A. H., Zariyantey, A. H., y Budin, S. B. (2016). Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 16(2), e132–e141. <https://doi.org/10.18295/squmj.2016.16.02.002>
- Mohammadipour, F., Niazi, M., Veiskaramian, A., Mokhayeri, Y., y Moayyedkazemi, A. (2020). Toward nonalcoholic fatty liver treatment; a review on herbal medicine treatment. *Journal of Critical Reviews*, 7(3), 554–564. <https://doi.org/10.31838/jcr.07.03.99>
- Mohammed, M. S., Osman, W. J. A., Garelnabi, E. A. E., Osman, Z., Osman, B., Khalid, H. S., Mohamed, M. A., y Osman, J. A. (2014). Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(4), 275–285.
- Mordes, J. P., y Rossini, A. A. (1981). Animal models of diabetes. *The American Journal of Medicine*, 70(2), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90772-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90772-5)
- Moreira, P., Santos, M., Moreno, A., Proenca, T., Seica, R., y Oliveira, C. R. (2004). Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes on Rat Brain Mitochondria. *Journal of Neuroendocrinology*, 16, 32–38.
- Muriel, P. (2000). Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *Journal of Applied Toxicology*, 20(3), 189–195. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(200005/06\)20:3<189::AID-JAT632>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(200005/06)20:3<189::AID-JAT632>3.0.CO;2-8)
- Murillo-Villicaña, M. (2020). *Efecto del extracto de acetato de etilo de Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas.*
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., y Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., y Van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>

- Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Vila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I., y Saavedra-Molina, A. (2012a). Hypolipidemic activity of *eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry Research International*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/603501>
- Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Vila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I., y Saavedra-Molina, A. (2012b). Hypolipidemic activity of *eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry Research International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/603501>
- Noriega-Cisneros, R., Peña-Montes, D. J., Huerta-Cervantes, M., Torres-Martínez, R., Huerta, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., y Saavedra-Molina, A. (2019). *Eryngium carlinae* Ethanol Extract Corrects Lipid Abnormalities in Wistar Rats with Experimental Diabetes. *Journal of Medicinal Food*, 00(0), 1–7. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0189>
- Nseir, W., Mograbi, J., y Ghali, M. (2012). Lipid-lowering agents in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis: Human studies. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(7), 1773–1781. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2118-3>
- Oltulu, F., Buhur, A., Gürel, Ç., Kuşçu, G. C., Dağdeviren, M., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Köse, T., y Yavaşoğlu, A. (2019). Mid-dose losartan mitigates diabetes-induced hepatic damage by regulating inos, enos, vegf, and nf-kb expressions. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(5), 1582–1589. <https://doi.org/10.3906/sag-1901-15>
- Ooi, B. K., Chan, K. G., Goh, B. H., y Yap, W. H. (2018). The Role of Natural Products in Targeting Cardiovascular Diseases via Nrf2 Pathway: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01308>
- Ortiz-Avila, O., Gallegos-Corona, M. A., Sánchez-Briones, L. A., Calderón-Cortés, E., Montoya-Pérez, R., Rodríguez-Orozco, A. R., Campos-García, J., Saavedra-Molina, A., Mejía-Zepeda, R., y Cortés-Rojo, C. (2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9614-z>
- Özbek, H., y Yılmaz, B. S. (2017). Anti-inflammatory and hypoglycemic activities of alpha-pinene. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 55(4), 7–14. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05522>
- Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., y Unakalamba, C. B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46–57. <https://doi.org/10.5897/jpap2013.0001>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., y Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(47), 1–15. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., y Petrosillo, G. (2014). Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(39), 14205–14218. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14205>
- Paşayeva, L., Şafak, E. K., Arigün, T., Fatullayev, H., y Tugay, O. (2020). In vitro antioxidant capacity

and phytochemical characterization of *Eryngium kotschy* Boiss. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 8(1), 18–31.

- Peña-Montes, D. J., Huerta-Cervantes, M., Ríos-Silva, M., Trujillo, X., Cortés-Rojo, C., Huerta, M., y Saavedra-Molina, A. (2020). Effects of dietary iron restriction on kidney mitochondria function and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Mitochondrion*, 54, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.07.001>
- Peña-Montes, D. J., Huerta-Cervantes, M., Ríos-Silva, M., Trujillo, X., Huerta, M., Noriega-Cisneros, R., Salgado-Garciglia, R., y Saavedra-Molina, A. (2019). Protective effect of the hexanic extract of *eryngium carlinae* inflorescences in vitro, in yeast, and in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Antioxidants*, 8(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox8030073>
- Pereira, C. G., Locatelli, M., Innosa, D., Cacciagrano, F., Polesná, L., Santos, T. F., Rodrigues, M. J., y Custódio, L. (2019). Unravelling the potential of the medicinal halophyte *Eryngium maritimum* L.: In vitro inhibition of diabetes-related enzymes, antioxidant potential, polyphenolic profile and mineral composition. *South African Journal of Botany*, 120, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.013>
- Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Moreno, J. A., Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., Loarca-Piña, G., y Reynoso-Camacho, R. (2016). Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *Journal of Functional Foods*, 20, 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.024>
- Petrosillo, G., Portincasa, P., Grattagliano, I., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F. M., Ferri, D., y Paradies, G. (2007). Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1767, 1260–1267. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.07.011>
- Pierantonelli, I., y Svegliati-Baroni, G. (2019). Nonalcoholic fatty liver disease: basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH. *Transplantation*, 103(1), 1–13. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002480>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., y Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Rachana, Thakur, S., y Basu, S. (2015). Oxidative stress and diabetes. En *Free Radicals in Human Health and Disease*. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_16
- Radenković, M., Stojanović, M., y Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Rains, J. L., y Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006>
- Rashmi, R., Magesh, S. B., Ramkumar, K. M., Suryanarayanan, S., y SubbaRao, M. V. (2017). Antioxidant potential of naringenin helps to protect liver tissue from streptozotocin-induced damage. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 7(1), 76–84.

- Reis Nunes, C., Barreto Arantes, M., Menezes de Faria Pereira, S., Leandro da Cruz, L., De Souza Passos, M., Pereira de Moraes, L., Curcino Vieira, I. J., y Barros de Oliveira, D. (2020). Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, 25(3726), 1–22.
- Rodés, J., Benhamou, J.-P., Blei, A. T., Reichen, J., y Rizzetto, M. (2007). *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice* (J. Rodés, J.-P. Benhamou, A. T. Blei, J. Reichen, y M. Rizzetto (eds.); 3a ed.). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1088/0004-637X/715/1/362>
- Rodríguez, V., Plavnik, L., y Tolosa de Talamoni, N. (2018). Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105(May), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.120>
- Rosado-pérez, J., y Mendoza-núñez, V. M. (2007). Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 32(2), 58–69.
- Rui, L. (2017). Energy Metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 25(5), 1032–1057. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>.Application
- Rungtung, W., Ratha, K. K., Dutta, S., Dixit, A. K., y Hazra, J. (2015). World Journal of Pharmaceutical Research. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(7), 604–613.
- Saavedra-Molina, A., y Devlin, T. M. (1997). Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Aminoacids*, 12, 293–298.
- Saavedra-Molina, Alfredo, Salgado-Garciglia, R., Noriega-Cisneros, R., Esquivel-Gutiérrez, E. R., Manzo-Avalos, S., Cortés-Rojo, C., y Montoya-Pérez, R. (2014). Oxidative stress in diabetes and hypertension treated with alternative therapy of medicinal plants. En *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation* (pp. 205–218).
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., y Latha, L. Y. (2011). EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS' EXTRACTS. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69153-2_6
- Schmatz, R., Perreira, L. B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., Gutierrez, J., Bagatini, M., Martins, C. C., Abdalla, F. H., Daci Da Silva Serres, J., Zanini, D., Vieira, J. M., Cardoso, A. M. H., Schetinger, M. R., y Morsch, V. M. (2012). Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*, 94(2), 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.08.005>
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Lambelet, P., Huynh-ba, T., Mcphail, D., Skibsted, L. H., y Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation . Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging , lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212(3), 319–328. <https://doi.org/10.1007/s002170000256>
- Sepanlou, M. G., Ardakani, M. M., Hajimahmoodi, M., Sadrai, S., Amins, G.-R., Sadeghi, N., y Lamardi, S. N. S. (2019). Ethnobotanical and traditional uses, phytochemical constituents and biological activities of *Eryngium* species growing in Iran. *Traditional Medicine Research*, 4(3,

- SI), 148–159. <https://doi.org/10.12032/TMR20190412114>
- Shi, Z., Li, T., Liu, Y., Cai, T., Yao, W., Jiang, J., He, Y., y Shan, L. (2020). Hepatoprotective and Anti-Oxidative Effects of Total Flavonoids From Qu Zhi Qiao (Fruit of *Citrus Paradisi* cv. Changshanhuoyou) on Nonalcoholic Steatohepatitis In Vivo and In Vitro Through Nrf2-ARE Signaling Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00483>
- Sies, H., y Jones, D. (2007). Oxidative stress. En *Encyclopedia of stress* (2a ed., Vol. 3, pp. 45–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1201/b12948>
- Singh, A., Le, P., Lopez, R., y Alkhoury, N. (2018). The utility of noninvasive scores in assessing the prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in type 1 diabetic patients. *Hepatology International*, 12(1), 37–43. <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9840-z>
- Skat-Rørdam, J., Højland Ipsen, D., Lykkesfeldt, J., y Tveden-Nyborg, P. (2019). A role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 124(5), 528–537. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13190>
- Sobhi, W., y Khenchouche, A. (2020). Involvement of Oxidative Stress in Type 1 Diabetes. *American Journal of Biomedical Science and Research*, 6(6), 538–543. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.06.001100>.Received
- Sun, B., y Karin, M. (2008). NF- κ B signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*, 27(48), 6228–6244. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.300>
- Ullah, A., Khan, A., y Khan, I. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>
- Usman, U., Bakar, A., y Mohamed, M. (2015). A Review on Experimental Methods of Diabetic Research: Advantages and Limitations. *Annual Research & Review in Biology*, 7(2), 100–108. <https://doi.org/10.9734/arrb/2015/17404>
- Van De Wier, B., Koek, G. H., Bast, A., y Haenen, G. R. M. M. (2017). The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 834–855. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.952399>
- Vasconcelos Barros, B. S., Conte Santos, D., Haas Pizarro, M., Gomes Nunes de Melo, L., y Brito Gomes, M. (2017). Type 1 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: When should we be concerned? a nationwide study in Brazil. *Nutrients*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu9080878>
- Vijayalakshmi, M., y Ruckmani, K. (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3), 570–572. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i3.27663>
- Villar del Fresno, Á. M. (1999). *FARMACOGNOSIA GENERAL* (Síntesis (ed.); 1a ed.).
- Wang, K., Tan, W., Liu, X., Deng, L., Huang, L., Wang, X., y Gao, X. (2021). New insight and potential therapy for NAFLD: CYP2E1 and flavonoids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 137(February), 111326. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111326>

- Wang, L., Zhang, B., Huang, F., Liu, B., y Xie, Y. (2016). Curcumin inhibits lipolysis via suppression of ER stress in adipose tissue and prevents hepatic insulin resistance. *Journal of Lipid Research*, 57(7), 1243–1255. <https://doi.org/10.1194/jlr.M067397>
- Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G., y Li, S. (2012). Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). *Pharmaceutical Crops*, 3(1), 99–120. <https://doi.org/10.2174/2210290601203010099>
- Watt, M. J., Miotto, P. M., De Nardo, W., y Montgomery, M. K. (2019). The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, 40(5), 1367–1393. <https://doi.org/10.1210/er.2019-00034>
- Wetzels, S., Wouters, K., Schalkwijk, C. G., Vanmierlo, T., y Hendriks, J. J. A. (2017). Methylglyoxal-derived advanced glycation endproducts in multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020421>
- WHO. (1999). Definition, diagnosis, and classification of Diabetes Mellitus and its complications. En *Ameliorating Mental Disability: Questioning Retardation* (pp. 1–66). https://doi.org/10.5005/jp/books/12626_7
- Wu, C. H., Lin, M. C., Wang, H. C., Yang, M. Y., Jou, M. J., y Wang, C. J. (2011). Rutin Inhibits Oleic Acid Induced Lipid Accumulation via Reducing Lipogenesis and Oxidative Stress in Hepatocarcinoma Cells. *Journal of Food Science*, 76(2), T65–T72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02033.x>
- Xiao, J., So, K. F., Liong, E. C., y Tipoe, G. L. (2013). Recent advances in the herbal treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(2), 88–94. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.110411>
- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J., y Li, H.-B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(96), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Xu, Y., Guo, W., Zhang, C., Chen, F., Tan, H. Y., Li, S., Wang, N., y Feng, Y. (2020). Herbal Medicine in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases-Efficacy, Action Mechanism, and Clinical Application. *Frontiers in Pharmacology*, 11(601), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00601>
- Yamakura, F., y Kawasaki, H. (2010). Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.010>
- Yazdi, H. B., Hojati, V., Shiravi, A., Hosseinian, S., Vaezi, G., y Hadjzadeh, M. A. R. (2019). Liver dysfunction and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: Protective role of *Artemisia turanica*. *Journal of Pharmacopuncture*, 22(2), 109–114. <https://doi.org/10.3831/KPI.2019.22.014>
- Younossi, Z. M., Golabi, P., de Avila, L., Paik, J. M., Srishord, M., Fukui, N., Qiu, Y., Burns, L., Afendy, A., y Nader, F. (2019). The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, 71(4), 793–801.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>

Zhang, Q., Yang, W., Liu, J., Liu, H., Lv, Z., Zhang, C., Chen, D., y Jiao, Z. (2020). Identification of Six Flavonoids as Novel Cellular Antioxidants and Their Structure-Activity Relationship. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4150897>

Zheng, Y., Ley, S. H., y Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

Ziamajidi, N., Behrouj, H., Abbasalipourkibir, R., y Lotfi, F. (2018). Ameliorative Effects of Allium sativum Extract on iNOS Gene Expression and NO Production in Liver of Streptozotocin + Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(2), 147–153. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0656-3>