



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas

Área temática: Biotecnología Alimentaria

Facultad de Químico Farmacobiología

TESIS

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de
ratas diabéticas”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:

Q.F.B Marina Murillo Villicaña

DIRECTORES DE TESIS:

D.C Asdrúbal Aguilera Méndez
D. C. Alfredo Saavedra Molina

Morelia, Michoacán, julio de 2020

El presente trabajo se realizó en el:

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Laboratorio de Bioquímica

Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición

Edificio B3, Ciudad Universitaria

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Dedicatoria

A Dios que me ha brindado la fuerza para seguir adelante.

A mis padres, José Luis y Trinidad que siempre me han apoyado y comprendido. Los
quiero mucho.

A mis hermanos Alma y Vicente, en especial a mi hermana Mayra, que siempre ha estado
conmigo en las buenas y en las malas, sabes que mis logros también son tuyos.

A mis abuelitos y a mis tías que me quieren y escuchan como si fuera su hija.

A mi novio Ricardo, que me ha acompañado como amigo y como pareja en todo momento.

A mis amigos, que me brindaron la oportunidad de conocerlos y me han regalado un sinfín
de momentos inolvidables.

Y finalmente, agradezco a los animalitos de experimentación. La investigación no sería
posible sin ellos.

*“Comienza haciendo lo necesario, después lo que es posible, y de pronto
estarás haciendo lo imposible”. San Francisco de Asís.*

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Agradecimientos

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en particular al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria por mi formación académica.

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

A mi asesor, el D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez por su apoyo y consejos recibidos durante la realización de este trabajo y en especial por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto como su alumna.

A mi co-asesor, el D.C. Alfredo Saavedra Molina por su asesoría, apoyo y ánimos recibidos desde el primer día que llegue al laboratorio de Bioquímica, pero sobre todo su confianza y la oportunidad de laborar en este proyecto de investigación a un lado de usted y su equipo de trabajo. Siempre se lo voy a agradecer.

Al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por sus enseñanzas y consejos recibidos en clase, pero especialmente por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Biotecnología vegetal.

A los miembros de mi comité sinodal, los doctores Rafael Salgado Garciglia, Héctor Eduardo Martínez Flores y Ruth Noriega Cisneros, por sus observaciones y aportaciones que enriquecieron este proyecto de investigación.

Al M.C Donovan Javier Peña Montes y a la M.C Maribel Huerta Cervantes, por su apoyo incondicional, consejos, observaciones y comentarios realizados durante el trabajo experimental, pero en especial por su amistad y compañía.

A la Q.F.B Mónica Clemente Guerrero, por sus consejos y apoyo incondicional durante el desarrollo de esta investigación.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Abreviaturas

ACAT Acetil-CoA acetiltransferasa	GSH Glutación reducido
ACC Acetil-CoA carboxilasa	GSSG Glutación oxidado
ADA Asociación Americana de Diabetes	HbA1c Hemoglobina A1c
ADN Ácido desoxirribonucleico	HDL Lipoproteína de alta densidad
ARNm Ácido ribonucleico mensajero	IAP Índice aterogénico plasmático
AST Aspartato amino transferasa	INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ATP Adenosín trifosfato	IR Receptor de Insulina
CAT Catalasa	IRS Sustrato del receptor de insulina
CTE Cadena de transporte de electrones	LDL Lipoproteína de baja densidad
DM Diabetes mellitus	LT Lípidos totales
DMSO Dimetilsulfóxido	MTTP Proteína microsomal de transporte de triacilglicéridos
EHGNA Enfermedad del hígado graso no alcohólico	NADH Nicotinamida-adenina-dinucleótido
EHNA Esteatohepatitis no alcohólica	NADPH Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
EJS Extracto de <i>Justicia spicigera</i>	NEFA Ácidos grasos no esterificados
ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	NOM Norma Oficial Mexicana
ENT Enfermedades no transmisibles	OMS Organización Mundial de la Salud
EO Estrés oxidativo	PBS Solución amortiguadora de fosfatos
ERO Especies reactivas de oxígeno	PC Piruvato carboxilasa
FA Fosfatasa alcalina	PCC Propionil-coenzyma A carboxilasa
FADH Flavín adenín dinucleótido	PEPCK Fosfoenol-piruvato carboxicinas
FID Federación Internacional de Diabetes	PI3-K 1-Fosfatidilinositol 3-Cinasa
GGT Gamma Glutamyl Transferasa	RL Radicales libres
GLUT Transportador de glucosa	RPM Revoluciones por minuto
GPx Glutación peroxidasa	
GR Glutación reductasa	

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

SGLT Transportadores de Sodio-Glucosa

SIDA Síndrome de inmunodeficiencia
adquirida

SOD Superóxido dismutasa

SOG Sobrecarga oral de glucosa

SREPB-1c Proteína-1c de unión a
elementos reguladores de esteroides

VLDL Lipoproteína de muy baja densidad

STZ estreptozotocina

TG Triacilglicéridos

UV Ultra violeta

VIH Virus de inmunodeficiencia
adquirida

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Índice general	
Índice de figuras.....	I
Índice de tablas.....	I
Índice de gráficas.....	I
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL SUMMARY	3
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
I.1. Diabetes mellitus.....	5
I.1.2. Clasificación y diagnóstico.....	5
I.1.2.1. Diabetes mellitus tipo 1	6
I. 1. 2. 2. Diabetes mellitus tipo 2	6
I. 1. 2. 3. Diagnóstico	6
I.1.3. Epidemiología	7
I.2. La mitocondria	8
I.3. Especies reactivas	9
I.4. Estrés oxidativo	9
I.5. Diabetes y estrés oxidativo.....	10
I.6. Transportadores de glucosa (GLUT)	10
I.7. Dislipidemia diabética.....	11
I.8. Hígado y diabetes	11
I.9. Antioxidantes	12
I.9.1. Antioxidantes endógenos.....	13
I.9.2. Antioxidantes exógenos	14
I.9.2.1. Biotina	15
I.9.2.2. Metabolitos secundarios	16
I.9.2.2.2. Influencia de los factores ambientales en la producción de metabolitos secundarios.....	17
I.9.2.2.2. Metabolitos secundarios con propiedades hipoglucémicas.....	17
I.9.2.2.1. <i>Justicia spicigera</i>	18
I.9.2.2.1.1. Propiedades de <i>Justicia spicigera</i>	19
II ANTECEDENTES.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	21

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

V.1 Objetivo general	21
V.1.1. Objetivos particulares.....	21
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
VII. RESULTADOS	24
VI.1. Capítulo 1: Actividad hipoglucémica, hipolipemiente y antioxidante de los compuestos del extracto de acetato de etilo de <i>Justicia spicigera</i>, durante los periodos de primavera-verano y otoño-invierno en suero e hígado de ratas diabéticas.....	24
VII. 2. Capítulo 2. Efecto sinérgico de la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de <i>Justicia spicigera</i> y biotina en hígado de ratas diabéticas.....	56
VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	90
IX. CONCLUSIÓN GENERAL.....	94
X. REFERENCIAS GENERALES.....	95

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la biotina	16
Figura 2. <i>Justicia spicigera</i>	19
Figura 3. Porcentaje de ganancia de peso al final del tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	34
Figura 4. Niveles de glucemia obtenidos durante el tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno.....	35
Figura 5. Niveles de triacilglicéridos obtenido durante el tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	36
Figura 6. Porcentaje de peso del hígado obtenido al final del tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	37
Figura 7. Niveles de triacilglicéridos hepáticos obtenido al final del tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	38
Figura 8. Actividad de la enzima SOD en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	42
Figura 9. Actividad de la enzima CAT en homogenado de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	43
Figura 10. Niveles de glutatión en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	44
Figura 11. Porcentaje de glutatión reducido en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	44
Figura 12. Porcentaje de glutatión oxidado en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	45
Figura 13. Relación de GSH/ GSSG en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	45
Figura 14. Porcentaje de ganancia de peso al final del tratamiento con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	67

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Figura 15. Niveles de glucemia obtenidos durante el tratamiento con biotina (2 mg/kg) y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> (80 mg/kg) recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	68
Figura 16. Niveles de triacilglicéridos obtenidos durante el tratamiento con biotina (2 mg/kg) y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> (80 mg/kg) recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	69
Figura 17. Porcentaje de peso del hígado obtenido al final del tratamiento con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	70
Figura 18. Niveles de triacilglicéridos hepáticos obtenido al final del tratamiento con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	71
Figura 19. Actividad de la enzima SOD en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	75
Figura 20. Actividad de la enzima CAT en homogenado de hígado de ratas tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	76
Figura 21. Niveles de glutatión en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	77
Figura 22. Porcentaje de GSH en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	77
Figura 23. Porcentaje de GSH en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	78
Figura 24. Relación de GSH/ GSSG en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de <i>J. spicigera</i> recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	78

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus	7
Tabla 2. Países con mayor número de personas con diabetes mellitus.....	8
Tabla 3. Perfil de lípidos en suero al final del tratamiento con extracto de <i>Justicia spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno	39

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Tabla 4. Pruebas de función hepática obtenido en suero al final del tratamiento con extracto de <i>Justicia spicigera</i> recolectada durante las temporadas de primavera-verano y otoño – invierno.....	41
Tabla 5. Perfil de lípidos obtenido en suero al final del tratamiento con biotina y con extracto de acetato de etilo de <i>Justicia spicigera</i>	72
Tabla 6. Pruebas de función hepática obtenido en suero al final del tratamiento con biotina y con extracto de acetato de etilo de <i>Justicia spicigera</i>	74

RESUMEN GENERAL

La presente investigación se dirigió a estudiar el efecto de los compuestos presentes en el extracto de *Justicia spicigera* recolectada en diferentes temporadas del año combinado con la biotina, en un modelo de ratas diabéticas inducidas mediante una dosis única de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (40 mg/kg). Se utilizaron 120 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 450-500 g, las cuales fueron divididas al azar en seis grupos que recibieron tratamiento durante un periodo de 60 días, de la siguiente manera: un grupo normoglucémico control (NC) y un grupo diabético control (DC) administrados únicamente con el vehículo (DMSO 1%), un grupo normoglucémico (NEPV) y un grupo diabético (DEPV) administrados con el extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* correspondiente al periodo de primavera – verano, un grupo normoglucémico (NEOI) y un grupo diabético (DEOI) administrados con el extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* correspondiente al periodo de otoño – invierno, un grupo normoglucémico (NB) y un grupo diabético administrados durante 30 días con biotina (DB), un grupo normoglucémico (NEPVB) y un grupo diabético (DEPVB) administrados durante 60 días con el extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* correspondiente al periodo de primavera – verano y por 30 días con biotina, un grupo normoglucémico (NEOIB) y un grupo diabético (DEOIB) administrados durante 60 días con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de otoño – invierno y por 30 días con biotina. Durante el tratamiento se determinó el peso y los niveles de glucemia y triacilglicéridos. Concluido el tratamiento, el hígado fue diseccionado y homogeneizado para determinar la concentración de lípidos hepáticos y la actividad de la enzima catalasa (CAT), posteriormente fueron extraídas las mitocondrias donde se llevó a cabo la determinación de la actividad del antioxidante enzimático superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). A partir de las muestras sanguíneas, se evaluó en suero las pruebas de perfil de lípidos y de función hepática. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano posee efecto hipoglucémico, hipolipemiante y antioxidante. Además, fue capaz de disminuir el daño hepático y la posible aparición de esteatosis hepática en la patología diabética. Por otro lado, el extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno únicamente ejerció efecto hipolipemiante, lo cual

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

indica que posiblemente los compuestos responsables de disminuir el perfil lipídico en ratas diabéticas se encuentran indistintamente en ambas estaciones climáticas a los que fueron expuestos. Por otro lado, el tratamiento combinado de biotina con extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera – verano presenta un efecto hipolipemiente y antioxidante significativo en hígado de ratas diabéticas, lo cual podría estar relacionado a los efectos que biotina y los componentes del extracto presentan de manera individual, convirtiéndose en un potencial tratamiento para evitar la dislipidemia diabética y la aparición de hepatopatías de personas que padecen diabetes mellitus.

Palabras clave: Diabetes, *Justicia spicigera*, biotina, hígado y diabetes, estrés oxidativo, dislipidemia diabética.

GENERAL SUMMARY

The present investigation was directed to study the effect of the compounds present in the *Justicia spicigera* extract collected at different seasons of the year combined with biotin, in a model of diabetic rats induced by a single dose of streptozotocin (STZ) intraperitoneally (40 mg / kg). 120 male rats of the Wistar strain weighing between 450-500 g were used, which were randomly divided into six groups that received treatment over a period of 60 days, as follows: a control normoglycemic group (NC) and a control diabetic group (DC) administered only with the vehicle (1% DMSO). A normoglycemic group (NEPV) and a diabetic group (DEPV) administered with the acetate extract spicigera ethyl acetate corresponding to the spring - summer period. A normoglycemic group (NEOI) and a diabetic group (DEOI) administered with *J. spicigera* ethyl acetate extract corresponding to the autumn - winter period. A normoglycemic group (NB) and a diabetic group administered for 30 days with biotin (DB). A normoglycemic group (NEPVB) and a diabetic group (DEPVB) administered for 60 days with the extract of ethyl acetate of *J. spicigera* corresponding to the spring-summer period and for 30 days with biotin. A normoglycemic group (NEOIB) and a diabetic group (DEOIB) administered for 60 days with the ethyl acetate extract of *J. spicigera* corresponding to autumn - winter period and for 30 days with biotin. During the treatment, the weight and the levels of glycemia and triacylglycerides were determined. After the treatment, the liver was dissected and homogenized to determine the concentration of liver lipids and the activity of the enzyme catalase (CAT), later the mitochondria were extracted where the activity of the enzyme antioxidant superoxide dismutase (SOD) was carried out) and levels of total glutathione, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). From the blood samples, the lipid profile and liver function tests were evaluated in serum. The results obtained showed that the extract obtained during the spring - summer season has a hypoglycemic, lipid lowering and antioxidant effect. In addition, it was able to decrease liver damage and the possible appearance of liver steatosis in diabetic pathology. On the other hand, the extract obtained during the autumn-winter season only exerted a lipid-lowering effect, which indicates that possibly the compounds responsible for reducing the lipid profile in diabetic rats are found indiscriminately in both climatic seasons to which they were exposed. On the other hand, the combined treatment of biotin with *J. spicigera* extract

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

obtained during the spring-summer season has a significant lipid-lowering and antioxidant effect on the liver of diabetic rats. Which could be related to the effects that biotin and the components of the extract present individually, becoming a potential treatment to prevent diabetic dyslipidemia and the appearance of liver disease in people with diabetes mellitus.

Key words: Diabetes, *Justicia spicigera*, biotin, liver and diabetes, oxidative stress, diabetic dyslipidemia.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto heterogéneo de síndromes de etiopatogenia multifactorial. El nexo común es el trastorno metabólico, fundamentalmente la hiperglucemia crónica, aunque también alteraciones en el metabolismo lipídico y proteico. Dichas alteraciones son debidas a un déficit relativo o absoluto de insulina, junto con alteraciones en su mecanismo de acción fundamentalmente en el caso de la DM tipo 2 (**Luque, 2011**). Los síntomas clínicos de hiperglucemia comprenden poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, cansancio, debilidad, visión borrosa, infecciones superficiales frecuentes y cicatrización lenta. Las alteraciones metabólicas están relacionadas fundamentalmente con la hiperglucemia (diuresis osmótica) y con el estado catabólico del paciente, pérdida de glucosa por la orina, destrucción muscular por la degradación de proteínas y disminución de la síntesis proteica (**Powers, 2012**). La diabetes se puede asociar con complicaciones agudas relacionadas con accidentes cardiovasculares o cerebrovasculares y riesgo vital, en caso de no tratamiento urgente. Igualmente, la hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a daños a largo plazo, que provocan disfunción y fallo de varios órganos: en especial, ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (**Mediavilla, 2001**).

I.1.2. Clasificación y diagnóstico

El comité de expertos de la ADA (Asociación Americana de Diabetes por sus siglas en inglés, *American Diabetes Association*), establece la siguiente clasificación etiológica de la DM:

- 1.- Diabetes tipo 1 es debido a destrucción autoinmune de las células β , generalmente conduce a insulinopenia.
- 2.-Diabetes tipo 2 es debida a la pérdida progresiva de células β en el contexto de la resistencia a la insulina.
- 3.-Diabetes mellitus gestacional es la diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no era evidentemente diabetes antes de la gestación.
- 4.-Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica, como diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (Maturity Onset Diabetes of the Young, por sus siglas en inglés MODY), enfermedades del

páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por sustancias químicas (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH / SIDA o después del trasplante de órganos) (ADA, 2019).

Las dos principales categorías de esta clasificación son:

I.1.2.1. Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes tipo 1 es un trastorno autoinmune crónico que se presenta en individuos genéticamente susceptibles y/o por factores ambientales (Atkinson y Eisenbarth, 2001), donde el sistema inmunitario del propio cuerpo ataca a las células beta en los islotes de Langerhans del páncreas, destruyéndolos o dañándolos lo suficiente como para reducir y eventualmente eliminar la producción de insulina (Van-Belle *et al.*, 2011).

I. 1. 2. 2. Diabetes mellitus tipo 2

En la diabetes tipo 2, la hiperglucemia es el resultado de la incapacidad de las células del cuerpo de responder totalmente a la insulina, lo que se conoce como “resistencia a la insulina”. Durante el estado de resistencia a la insulina, la hormona no es eficaz, lo que deriva en un aumento de la producción de insulina. Con el tiempo, se puede llegar a una producción de insulina inadecuada porque las células beta pancreáticas no cumplen con la demanda (FID, 2019).

I. 1. 2. 3. Diagnóstico

La diabetes puede diagnosticarse según los criterios de glucosa en plasma, ya sea glucosa plasmática en ayunas o la glucosa plasmática a las 2 horas de la sobrecarga oral de glucosa (SOG) de 75 g, o los criterios de la prueba de hemoglobina glucosilada (HbA1c) (ADA, 2019). Los criterios diagnósticos para la DM empleados en la actualidad son los de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Federación Internacional de Diabetes (FID) y de la ADA que se presentan en la tabla 1.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus

ADA 2019	OMS-FID 2017
1. Glucosa al azar ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).	1. Glucosa al azar > 200 mg/dL (11.1 mmol/L).
2. Glucosa en plasma en ayunas ≥ 126 mg/dL.	2. Glucosa en plasma en ayunas ≥ 126 mg/dL.
3. Glucosa en plasma a 2 h de SOG de 75g. ≥ 200 mg/dL.	3. Glucosa en plasma a 2 h de SOG de 75g. ≥ 200 mg/dL.
4. HbA1c $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol). El diagnóstico requiere de dos resultados de prueba anormales de la misma muestra o en dos muestras de prueba separadas.	4. HbA1c $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol) si: -Se garantizan estándares de calidad en su determinación y referencias internacionales. -No existe hemoglobinopatía o enfermedad de base que pueda alterar su determinación. (Ejemplo: Anemia falciforme, cirrosis, insuficiencia renal crónica avanzada).
En ausencia de descompensación metabólica estos criterios, salvo el 1, deben confirmarse repitiendo el análisis otro día, preferiblemente con la misma prueba diagnóstica.	El criterio 1 es suficiente para el diagnóstico de DM. La SOG se recomienda en la práctica habitual cuando el paciente presenta una glucemia alterada en ayunas. Los test con glucosa siguen siendo de elección frente a la HbA1c. Una HbA1c $<6,5\%$ no excluye el diagnóstico de DM.
Tomado y modificado de OMS-FID, 2017, ADA, 2019. SOG: Sobrecarga oral de glucosa. HbA1c: Hemoglobina glicada.	

1.1.3. Epidemiología

La diabetes es un problema global. La población de ningún país es inmune a la diabetes y se espera que la epidemia continúe. La carga de la diabetes agota los presupuestos nacionales de atención médica, reduce la productividad, desacelera el crecimiento económico, causa un gasto catastrófico para los hogares vulnerables y desborda los sistemas de atención médica. Se estima que alrededor de 463 millones de personas en todo el mundo, o aproximadamente el 9.3% de los adultos de entre 20 y 79 años tienen diabetes, de este total alrededor del 90 % tienen diabetes tipo 2, entre el 8% al 8.5% tienen diabetes tipo 1 y del 1.5% al 2% tienen otros tipos de diabetes. Si estas tendencias continúan, para el año 2045, serán diagnosticados 700 millones de nuevos casos entre 18 y 99 años de edad. (FID, 2019).

Según la información referida por la federación internacional de la diabetes (FID) en 2019, México ocupó el sexto lugar a nivel mundial con 12.8 millones de personas que padecieron DM (tabla 2) de los cuales 2.7 millones de personas tenía más de 65 años de edad, además

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

representa el sexto país con mayor gasto total sanitario. Por otro lado, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en **2018** reportó que la DM ocupa el segundo lugar del total de las defunciones a nivel nacional y el primer lugar en muertes de personas con más de 65 años de edad. Sin embargo, 46.4% de las personas que viven con diabetes no realiza medidas preventivas para evitar o retrasar la aparición de complicaciones (ENSANUT, 2016).

Tabla 2. Países con mayor número de personas con diabetes mellitus

Lugar	País	Número de personas con Diabetes
1	China	116.4 millones (108.6 – 145.7)
2	India	77 millones (62.4 -96.4)
3	Estados Unidos	31.0 millones (26.7 – 35.8)
4	Pakistán	19.4 millones (7.9 – 30.4)
5	Brasil	16.8 millones (15.0 – 18.7)
6	México	12.8 millones (7.2 – 15.4)
7	Indonesia	10.7 millones (9.2 – 11.5)
8	Alemania	9.5 millones (7.8 – 10.6)
9	Egipto	8.9 millones (4.8 – 10.1)
10	Bangladesh	8.4 millones (7.0 – 10.7)
Tomado y modificado de FID, 2019. Los intervalos de confianza del 95 % se indican entre paréntesis.		

I.2. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo intracelular con una membrana externa, una membrana interna que forma crestas en el interior y una matriz en la que se encuentra sobre todo el ADN mitocondrial (Tuppen *et.al.*, 2010). La función esencial de la mitocondria es la síntesis de ATP. Desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético y en muchas reacciones metabólicas como la β oxidación de los ácidos grasos, el catabolismo de los aminoácidos, pero también en la apoptosis y en el envejecimiento (Bratic, 2010). La función esencial de la mitocondria es la síntesis de ATP. La conversión de glucosa en piruvato por la glucólisis, permite la síntesis de ATP por mol de glucosa en situación aerobia. Para ello, el piruvato debe entrar en el ciclo de Krebs para generar las formas reducidas dinucleótido de nicotinamida y adenina hidrogenado (NADH) y dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂), que proporcionarán los sustratos para la cadena de transporte de electrones (CTE).

Los ácidos grasos y la glutamina también pueden servir de sustratos para este metabolismo, mediante la acetil-Coenzima A (producto final de la betaoxidación de los ácidos grasos) y el alfacetoglutarato (uno de los metabolitos esenciales del ciclo de Krebs), respectivamente (Feillet *et al.*, 2014).

La CTE está constituida por cinco complejos cuya función es la síntesis de ATP. Los sustratos procedentes de la glucólisis y de la β -oxidación de los ácidos grasos proporcionan electrones a los complejos I a IV de la CTE, que los transfieren al espacio intermembranoso mitocondrial, lo que genera un gradiente electroquímico, que permite la síntesis de ATP mediante el complejo V (ATP sintasa) de la CTE (Wang, 1998).

I.3. Especies reactivas

El término especies reactivas hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres (RL) y los no radicales (Lozada y García, 2009). Los RL, son moléculas muy inestables, originadas mediante un proceso electroquímico por el cual un ion o átomo pierde uno o varios electrones, capaces de reaccionar con múltiples sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ADN (Halliwell y Aruoma, 1991).

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son pequeñas moléculas ubicuas y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la CTE y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo (Venereo, 2002).

I.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) se define como cualquier perturbación en el equilibrio de antioxidantes y prooxidantes por una formación excesiva y eliminación insuficiente de moléculas altamente reactivas (Asmat *et al.*, 2016) o por procesos catabólicos y anabólicos, principalmente a través de la CTE en los complejos mitocondriales (Yan, 2014). La exposición a ERO provoca agregación y fragmentación de proteínas como consecuencia de la combinación errónea entre los péptidos y sus respectivos enlaces, o como resultado de los

daños producidos durante la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN (Halliwell, 2006), lo cual puede ocasionar muerte celular (Asmat *et al.*, 2016).

I.5. Diabetes y estrés oxidativo

La glucosa es la principal molécula que se oxida para dar energía y la más abundante en la célula y en el organismo para fines metabólicos. En el metabolismo las ERO son producto de una reducción parcial del oxígeno, los electrones que adquiere son donados anómalamente por reacciones oxido-reductoras que lo reducen parcialmente por error, la reducción del oxígeno en el metabolismo es un paso necesario e indispensable, pero esos electrones adecuadamente otorgados, deberían de reducir el oxígeno hasta agua con la combinación de dos protones en la reacción. La reducción parcial da lugar a las más frecuentes ERO, el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), siendo los dos primeros radicales libres, llamados así por contener electrones desapareados (Calderón-Salinas, 2013). Por otro lado, la elevación del nivel de ERO en la diabetes puede deberse a una disminución de la destrucción o al aumento de la producción de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH – Px). La variación en los niveles de estas enzimas hace que los tejidos sean susceptibles al estrés oxidativo, lo que lleva al desarrollo de complicaciones diabéticas (Lipinski, 2001).

I.6. Transportadores de glucosa (GLUT)

El metabolismo de la glucosa aporta energía a la célula mediante la biosíntesis de adenosina-5'-trifosfato (ATP) a través de la glucólisis como vía catabólica. La homeostasis de la glucemia involucra tres procesos: 1) absorción de glucosa en el intestino delgado; 2) internalización y consumo de glucosa por los tejidos corporales, y 3) la producción hepática de glucosa (Scheepers *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2010). Para que los procesos anteriores se lleven a cabo, es necesaria la internalización de glucosa a la célula. Sin embargo, la membrana celular no es permeable a moléculas polares como la glucosa, por lo que es necesaria la participación de proteínas transportadoras acopladas a la membrana (Bell, 1990). Cada proteína transportadora, expresada en diferentes tejidos, posee una afinidad diferente para carbohidratos (Calvo *et al.*, 2010). En células eucariotas existen dos tipos de proteínas

transportadoras acopladas a la membrana: 1) los SGLT, localizados en intestino delgado y en tejido renal, encargados principalmente de la absorción y reabsorción de nutrientes, y 2) los GLUT, que actúan por difusión facilitada y están distribuidos diferencialmente en los tejidos corporales (Bell, 1990; Castrejón, 2007). En pacientes diabéticos la alteración en el transporte de glucosa es debida a defectos en la vía de señalización de insulina ocasionada por disminución o cambios en la actividad del receptor de insulina (IR) y del sustrato del receptor de insulina (IRS). La actividad de cinasa de serina del IR y del IRS se encuentra normal, mientras que la actividad de tirosina cinasa se encuentra disminuida. Lo anterior ocasiona una alteración en la cascada de señalización y, como consecuencia, una disminución en la actividad de cinasa PI3-K y PKB/AKT, lo que produce una deficiente translocación de GLUT4 intracitoplasmático a la superficie de la membrana celular (Koumanov *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010).

I.7. Dislipidemia diabética

La dislipidemia diabética se caracteriza por triacilglicéridos elevados en ayunas y posprandiales, colesterol HDL bajo, colesterol LDL elevado y el predominio de pequeñas partículas VLDL (Wu, 2014). Esto se debe a que cuando falta insulina la enzima lipasa sensible a la hormona cataliza la hidrólisis de los triacilglicéridos en el tejido adiposo, lo que resulta en la liberación de ácidos grasos a la circulación. Normalmente, la insulina suprime esta liberación y bloquea la liberación de ácidos grasos. Sin embargo, en los estados de resistencia a la insulina, la insulina no puede suprimir la liberación, lo que da como resultado una lipólisis mejorada y un mayor flujo de ácidos grasos al grupo de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma (Goldberg, 2006).

I.8. Hígado y diabetes

Órgano vital que se localiza debajo del diafragma. Tiene una amplia gama de funciones, incluido el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno cuando se activa mediante la insulina, y la liberación de glucosa en la sangre cuando se activa mediante el glucagón. (FID, 2019). Esto ha llevado a un gran trabajo de investigación sobre la expresión y la función de

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

los receptores que regulan la absorción y liberación de glucosa por los hepatocitos, en los cuales se ha documentado la expresión de GLUT-1, GLUT-2 (Tao *et al.*, 2008; Nordlie *et al.*, 1999), GLUT-9 (Keembiyehetty *et al.*, 2006) y GLUT-10 (McVie-wylie *et al.*, 2001) los cuales no son dependientes de insulina.

La diabetes se asocia con el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, incluidas sus manifestaciones más graves de esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (El-Serag, 2004). Esto se debe a que a nivel hepático la insulina activa el factor de transcripción SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein- 1c), lo cual aumenta la expresión de genes de la lipogénesis, aumenta la glucólisis, acelera el acúmulo de triacilglicéridos en los hepatocitos por síntesis *de novo* y disminuye su oxidación (Loria *et al.*, 2007). La teoría del sobreflujo establece que una vez que se excede la capacidad de los adipocitos para acumular triacilglicéridos, éstos se depositan en otros tejidos como el músculo y el hígado, ocasionando resistencia a la insulina en esos tejidos (Bugianesi *et al.*, 2005; Bonora *et al.*, 2004). La acumulación de grasa dentro del hepatocito puede proceder de tres fuentes: el 60 % proviene de los NEFA, el 34 % de incremento de la lipogénesis *de novo* y solo un 14 % de la grasa de la dieta (Donnelly *et al.*, 2005). Lo anterior se debe a que los órganos y tejidos que son blancos de la insulina como el hígado, en situación de resistencia a la insulina no solo disminuyen el gasto energético, sino que favorecen la producción de glucosa (glucogénesis) y ácidos grasos libres (Fernández-Real y Ricart, 1999; 2003).

Por otro lado, sabemos que la presencia de hígado graso y esteatohepatitis, incrementan el riesgo de desarrollar DM tipo 2 hasta cinco veces y que este riesgo aumenta en relación a la severidad del daño hepático. Si coexisten obesidad, resistencia a la insulina e hígado graso, el riesgo de desarrollar diabetes aumenta hasta catorce veces (FundHepa, 2016).

I.9. Antioxidantes

Un antioxidante es toda sustancia que retrasa o previene el deterioro o daño provocados por una oxidación (Youngson, 2003). Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los RL, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana

de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas (**Benito-Peinado *et al.*, 2014**).

De las numerosas clasificaciones que existen de antioxidantes, se recomienda adoptar la que los divide en endógenos, los que son sintetizados por la célula y exógenos, los cuales ingresan a través de los alimentos (**Rodríguez, 2001; Sánchez-Rodríguez, 2004**).

I.9.1. Antioxidantes endógenos

El sistema de defensa antioxidante se encuentra formado por elementos tanto enzimáticos como no enzimáticos, que actúan conjuntamente para así proteger a la célula. El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar el acúmulo de ERO como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL (**Yu, 1994; Chaudóère, 1999**).

Dentro del sistema de defensa antioxidante enzimático se encuentran las siguientes enzimas:

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

- La catalasa (CAT) realiza el metabolismo citosólico del H_2O_2 y se localiza en los peroxisomas. La CAT contiene moléculas de NADPH y se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad al sustrato. Tiene dos funciones, una catalítica y una peroxidativa. En la reacción catalítica utiliza como donadores a otras moléculas de H_2O_2 (**Miranda, 2008**). En la reacción peroxidativa la enzima utiliza como donadores de

hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído. Una molécula de catalasa es capaz de catalizar la transformación de alrededor de 1×10^7 moléculas de sustrato por segundo, la primera reacción tanto del mecanismo catalítico como peroxidativo es la heterólisis o rompimiento de los enlaces oxígeno-oxígeno, en la reacción catalítica se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno y forma agua (**Peraza-Reyes, 2008**).

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas que tienen como función capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al RL con el objetivo de estabilizarlo (**Bandyopadhyay, 1999; Larkins, 1999**).

- El glutatión (L-g-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina (**Meister, 1988; Kosower, 1969; Sastre, 2005; Townsend, 2003**). Esta molécula es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, donde se encuentran las mayores concentraciones (**Kaplowitz, 1985; Meister, 1988; Townsend, 2003; Raftos, 2010**). La molécula se encuentra libre y unida a proteínas. La concentración total de glutatión (GSHt) es la suma de la fracción de glutatión libre y la fracción de glutatión unida a proteínas. A su vez, la fracción libre está integrada por la forma tiol reducida llamada glutatión reducido (GSH) y la forma oxidada o disulfuro llamada glutatión oxidado (GSSG). La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se la encuentra en el interior de las células en concentraciones milimolares en el rango de 0,1 a 10 Mm (**Meister, 1988; Kosower, 1969; Sastre, 2005; Townsend, 2003**). En tanto que extracelularmente se encuentran niveles micromolares de GSH (**Pastore et al., 2003**).

I.9.2. Antioxidantes exógenos

Además de los efectos protectores de las defensas antioxidantes endógenas enzimáticas, el consumo de antioxidantes en la dieta es de gran importancia (**Ames et al., 1993**). Algunos son vitaminas (indispensables para la vida, tales como la vitamina A, C y E); otros están clasificados en varias familias de principios activos como los polifenoles y los fitoestrógenos.

Las plantas son una de las fuentes más prometedoras para descubrir nuevos agentes antioxidantes (**Martin y Ernest, 2003; Ziech *et al.*, 2012; Saavedra-Molina *et al.*, 2014**). Entre los que se encuentran los flavonoides y los taninos, ampliamente estudiados. Entre los flavonoides se pueden señalar sólo como ejemplo las antocianidinas (rojo-azulado de las fresas), catequinas (té verde y negro), citroflavonoides (naranja, que da sabor amargo a lo naranja, limón, toronja) e isoflavonoides (genisteína y daidzaína presentes en soya y sus derivados) (**Jiménez *et al.*, 2009**). Otro tipo de antioxidantes son los taninos (polifenoles) presentes en el vino, con su característica de astringencia. No sólo son útiles a la industria alimentaria sino también en la de cosméticos (**Reyes *et al.*, 2011**).

I.9.2.1. Biotina

La biotina es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B conocida como vitamina B7 o vitamina H (**Alban *et al.*, 2000**), cuya función más conocida en los organismos eucariontes es la de participar como grupo prostético de las enzimas acetil-CoA Carboxilasa (ACC) tanto de la isoforma citosólica (ACC1) como de la mitocondrial (ACC2); y de las enzimas mitocondriales piruvato carboxilasa (PC); propionil-CoA carboxilasa (PCC) y metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) (**Chapman y Cronan 1999**). Estas enzimas participan en diversos procesos metabólicos tales como la gluconeogénesis, la lipogénesis y el catabolismo de aminoácidos (**Alban *et al.*, 2000**). Además, la biotina participa sobre dos enzimas críticas del metabolismo de la glucosa: glucocinasa hepática (**Chauhan, 1991**) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa hepática (PEPCK) (**Dakshinamurti, 1994**). La glucocinasa funciona como el sensor de glucosa, al regular la tasa de glucólisis y la producción de moléculas de señalización necesarias para la secreción de insulina (**Romero, 1999**). La característica común de las reacciones catalizadas por las carboxilasas dependientes de biotina es la transferencia de un grupo carboxilo proveniente del bicarbonato a un sustrato aceptor, utilizando biotina como un grupo acarreador del grupo funcional carboxilo (**Alban *et al.*, 2000**). Además de su participación como grupo prostético de las carboxilasas, se ha reportado desde hace varios años que también modifica funciones biológicas como la proliferación celular, el desarrollo embrionario, funciones inmunológicas

y el metabolismo de lípidos y carbohidratos a través de un efecto sobre la expresión genética (Rodríguez-Melendez *et al.*, 2003; Pacheco-Alvarez *et al.*, 2002).

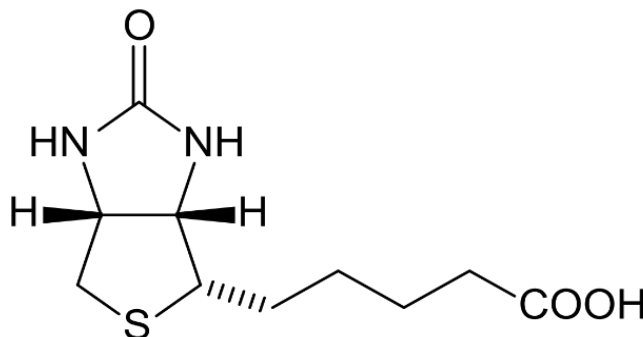


Figura 1. Estructura química de la biotina.

I.9.2.2. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios, en particular los alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos, son compuestos químicos que no actúan en el metabolismo primario de las plantas, pero intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. (Sepúlveda *et al.*, 2003; Granados *et al.*, 2008). Por lo tanto, están influenciadas por varios factores ambientales, incluidos los estímulos bióticos y abióticos que regulan la biosíntesis de metabolitos secundarios (Zhi-Li *et al.*, 2007). En respuesta a estas tensiones, las plantas de las mismas especies cultivadas en diferentes ambientes pueden tener diferencias en la concentración de un metabolito secundario particular. Por lo tanto, las características ambientales son factores decisivos en la biosíntesis de metabolitos secundarios. El estrés biótico en las plantas ocurre como resultado del daño causado por otros organismos vivos a las plantas, como bacterias, virus, hongos, parásitos, etc. Mientras que el estrés abiótico es causado por la intensidad de la luz, la disponibilidad de agua, la temperatura (calor y frío), tipo y composición del suelo, etc. que influyen en la calidad y productividad de las plantas (Radusiene *et al.*, 2012). El estrés causado por la radiación (luz UV) y productos químicos como minerales, toxinas, gases como oxígeno y ozono, contaminantes, pesticidas, metales (Ni, Cd, Co, Cr, Fe, Zn, Mn, etc.), reguladores del crecimiento (2,4-D, IAA y NAA) y las

sales también provocan tensiones abióticas en las plantas (**Ramakrishna y Ravishankar, 2011**).

I.9.2.2.2. Influencia de los factores ambientales en la producción de metabolitos secundarios

La síntesis de los metabolitos secundarios responde a factores ambientales, cambios estacionales y condiciones externas como la luz, la temperatura y la humedad creando una estrategia adaptativa que conduce a la tolerancia al estrés abiótico (**Morison y Lawlor, 1999; szakiel et al., 2011**). El crecimiento de las plantas depende de la temperatura adecuada. Las temperaturas altas y bajas tienen un efecto adverso en las plantas que confieren estrés por calor y frío respectivamente (**Yadav, 2010**). Varios estudios mostraron un aumento en la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas como respuesta a altas y bajas temperaturas (**Verma y Shukla, 2015**), así como a la exposición de luz solar. En un estudio realizado por Li *et al.*, (1996) se descubrió que las plantas de ginseng americano expuestas a la luz solar de manera prolongada tenían un contenido de ginsenósidos de raíz más alto que las expuestas a períodos más cortos de luz solar directa. Por otro lado Xingyuan *et al.*, (2009) informaron el efecto del CO₂ u ozono sobre las hormonas endógenas en las hojas de Ginkgo biloba.

I.9.2.2.2. Metabolitos secundarios con propiedades hipoglucémicas

Los metabolitos secundarios presentes en plantas con propiedades hipoglucémicas pertenecen a los grupos: terpenos, carotenoides, alcaloides, esteroides, taninos, polisacáridos, cumarinas, esteroides, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides (**Andrade-Cetto y Heinrich, 2005**). En particular, los flavonoides son considerados como agentes antidiabéticos potenciales porque ejercen múltiples acciones que son tanto hipoglucémicas (acción insulinomimética) como antihiperoglucémicas (secretagogo de insulina) (**Cazarolli et al., 2008**).

El kaempferitrin ha mostrado actividad hipoglucémica cuando se administra por vía oral en ratas diabéticas inducidas por aloxano (**De-Sousa et al., 2004; Jorge et al., 2004**). Jorge *et al.* (2004) propusieron que el flavonoide activa las vías de señalización de insulina,

aumentando así la captación de glucosa en los tejidos periféricos. En contribución a esta hipótesis, Tzeng *et al.* (2009) demostraron que el kaempferitrin estimula las vías de transducción de señalización de insulina clásicas en las células 3T3-L1: fosforilación del receptor de insulina, sustrato receptor de insulina 1 y otras proteínas reguladoras intracelulares, lo que aumenta la translocación de GLUT-4, responsable de la absorción de glucosa en casos sensibles a la insulina (Huang, 2007).

I.9.2.2.1. *Justicia spicigera*

Corresponde al reino Plantae, División Tracheophyta, Clase Magnoliopsida, Subclase Asteranae, Orden Lamiales, Familia Acanthaceae, Género *Justicia* y Especie *Justicia spicigera* Schlechtendal (ITIS, 2019).

Es conocida con diversos nombres comunes: micle, muitle, muicle, nicle o hierba tinta. Es una planta endémica de Mesoamérica, que crece desde México hasta el sur de Colombia (Vega *et al.* 2012). Este género es uno de los más amplios de la familia Acanthaceae, se reporta un promedio de 600 especies (Graham, 1988) y se registra como el más extenso, complejo y diverso de dicha familia, distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de América. Se puede encontrar en Belice, El Salvador, Honduras, Costa Rica y Nicaragua. En México, se ha reportado la presencia de *J. spicigera* en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luis Potosí, México, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán, Hidalgo y Michoacán. Las condiciones óptimas de desarrollo son en climas secos o semi secos, templado cálido, semi cálido, desde 0-3000msnm. Se localiza en jardines, caminos y carreteras y se asocia con vegetación perturbada en la zona tropical, de hojas caducas, semi caducifolios y bosques de hoja perenne, bosques espinosos, bosques de niebla, roble, pino y roble-pino (Baqueiro y Guerrero, 2014).

La planta es un arbusto densamente ramificado de 1 a 2 m de altura. Tiene hojas venosas que son más largas que anchas. Las flores son pequeñas de color naranja con forma larga y se agrupan en el extremo de la unión del tallo y de la hoja (Fig. 2) (García y León 2013).



Figura 2. *Justicia spicigera*

I.9.2.2.1.1. Propiedades de *Justicia spicigera*

J. spicigera produce metabolitos secundarios del tipo fenólico, como taninos, lignanos y flavonoides (Martínez, 1996). Además, se han reportado en hojas de *J. spicigera* la presencia de flavonoides como el kaempferitrin (kaempferol-3,7-O-dirhamnosido) (Euler *et al.*, 1982) y terpenoides como el β -sitosterol, β -glucosil-O-sitosterol y la criptoxantina (caroteno) (Domínguez *et al.*, 1990). Los lignanos también se han identificado en el género *Justicia* y tienen capacidad de captar radicales libres, como antiviral, antitumoral, hipoglucémica, antiobesidad y cardioprotectoras (Smeds *et al.*, 2012).

II ANTECEDENTES

En la medicina tradicional mexicana, las hojas de *Justicia spicigera* se usan ampliamente para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Johnson *et al.*, 2006). En estudios realizados por Ortiz-Andrade *et al.* (2012), se demostró que el extracto etanólico de *Justicia spicigera* (EJS) presenta efecto antioxidante en pruebas realizadas *in vitro* y efecto hipoglucémico en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina 100 mg / kg, atribuyendo este efecto al kaempferitrin, un compuesto fenólico abundante en el extracto etanólico de *Justicia spicigera* (Euler y Alam, 1982). El cual podría estar vinculado con uno o varios

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

mecanismos, como son: (a) mejora en la secreción de insulina y / o acción de la insulina, (b) la participación de un sistema antioxidante, (c) la mejora del metabolismo de la glucosa de las células β , (d) o la activación del sistema enzimático que genera AMP cíclico (**Ortíz-Andrade *et al.*, 2012**).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que las concentraciones farmacológicas de biotina tienen efectos hipoglucemiantes (**Koutsikos, 1996; Hemmati *et al.*, 2009; Albarracin *et al.*, 2007; Sahin *et al.*, 2013; Aldahmash *et al.*, 2016**) al mejorar la acción y la secreción de insulina (**Reddi *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 2012; De La Vega-Monroy *et al.*, 2013; Sahin *et al.*, 2013**) así como la tolerancia a la glucosa (**Reddi *et al.*, 1988; Zhang, 1996**), hipotrigliceridémicos (**Revilla-Monsalve *et al.*, 2006; Albarracin *et al.*, 2007; Aguilera-Méndez y Fernandez-Mejia, 2012; Larrieta *et al.*, 2010**) y antihipertensivos (**Watanabe *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2018, 2019**).

Los mecanismos subyacentes por los cuales la biotina ejerce estos efectos aún no se han esclarecido. En el páncreas, la suplementación con biotina *in vitro* e *in vivo* aumenta la expresión de ARNm de la insulina (**De La Vega-Monroy *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2002**), la glucocinasa pancreática (**Vilches-Flores *et al.*, 2010; Romero-Navarro *et al.*, 1999**) y otros genes de las células β pancreáticas que modulan la secreción de insulina (**De La Vega-Monroy *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2002; Vilches-Flores *et al.*, 2010; Romero-Navarro *et al.*, 1999; Borboni *et al.*, 1996; Sone *et al.*, 2000; Sone *et al.*, 1999; Matschinsky *et al.*, 1996**).

En un estudio realizado por Aguilera- Méndez *et al.*, (2018) se demostró que en un modelo de síndrome metabólico desarrollado por la ingestión crónica de fructosa, la biotina tenía un efecto protector sobre varias de sus manifestaciones, reduciendo la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la esteatosis hepática, la lipoperoxidación hepática y la hipertensión.

III. JUSTIFICACIÓN

No se han obtenido resultados concretos en cuanto a la función antioxidante, tanto de *Justicia spicigera*, como de biotina en hígado, ni se han evaluado los efectos de los componentes de

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

la planta actuando de manera conjunta con la biotina en un modelo de diabetes crónica, por lo que es de nuestro interés demostrar que los componentes de *Justicia spicigera* extraídos con un solvente de polaridad intermedia (acetato de etilo) en dos temporadas del año y administrados con la biotina presentan efecto sinérgico en un modelo diabético con 60 días de evolución.

IV. HIPÓTESIS

El extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina presentan efecto protector en hígado de ratas diabéticas

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Analizar el efecto protector hepático del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en ratas diabéticas.

V.1.1. Objetivos particulares

- 1) Evaluar la función hepática y el efecto hipolipidémico del extracto de *J. spicigera* y la biotina en ratas diabéticas.
- 2) Determinar la actividad antioxidante del extracto y la biotina en hígado de ratas diabéticas.
- 3) Determinar lípidos hepáticos de ratas diabéticas administradas con el extracto de *J. spicigera* y biotina.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Recolección de *J. spicigera* durante el periodo primavera- verano (27 abril / 25 agosto 2018)
Recolección de *J. spicigera* durante el periodo otoño- invierno (27 noviembre 2018 / 28 febrero 2019)



Obtención del extracto de acetato de etilo 100 mg/mL



**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

12 grupos de ratas macho Wistar n= 10			
1) Normoglucémicas + DMSO	<i>J. spicigera</i> (primavera – verano)	<i>J. spicigera</i> (otoño – invierno)	Biotina
	3) Normoglucémicas + Extracto	5) Normoglucémicas + Extracto	7) Normoglucémicas + Biotina
	4) Diabéticas + Extracto	6) Diabéticas + Extracto	
2) Diabéticas + DMSO	<i>J. spicigera</i> + Biotina (primavera – verano)	<i>J. spicigera</i> + Biotina (otoño – invierno)	8) Diabéticas + Biotina
	9) Normoglucémicas + Extracto + Biotina	11) Normoglucémicas + Extracto + Biotina	
	10) Diabéticas + Extracto + Biotina	12) Diabéticas + Extracto + Biotina	



Inducción de la diabetes con STZ (40 mg/Kg) en buffer de citrato a un pH 4.5

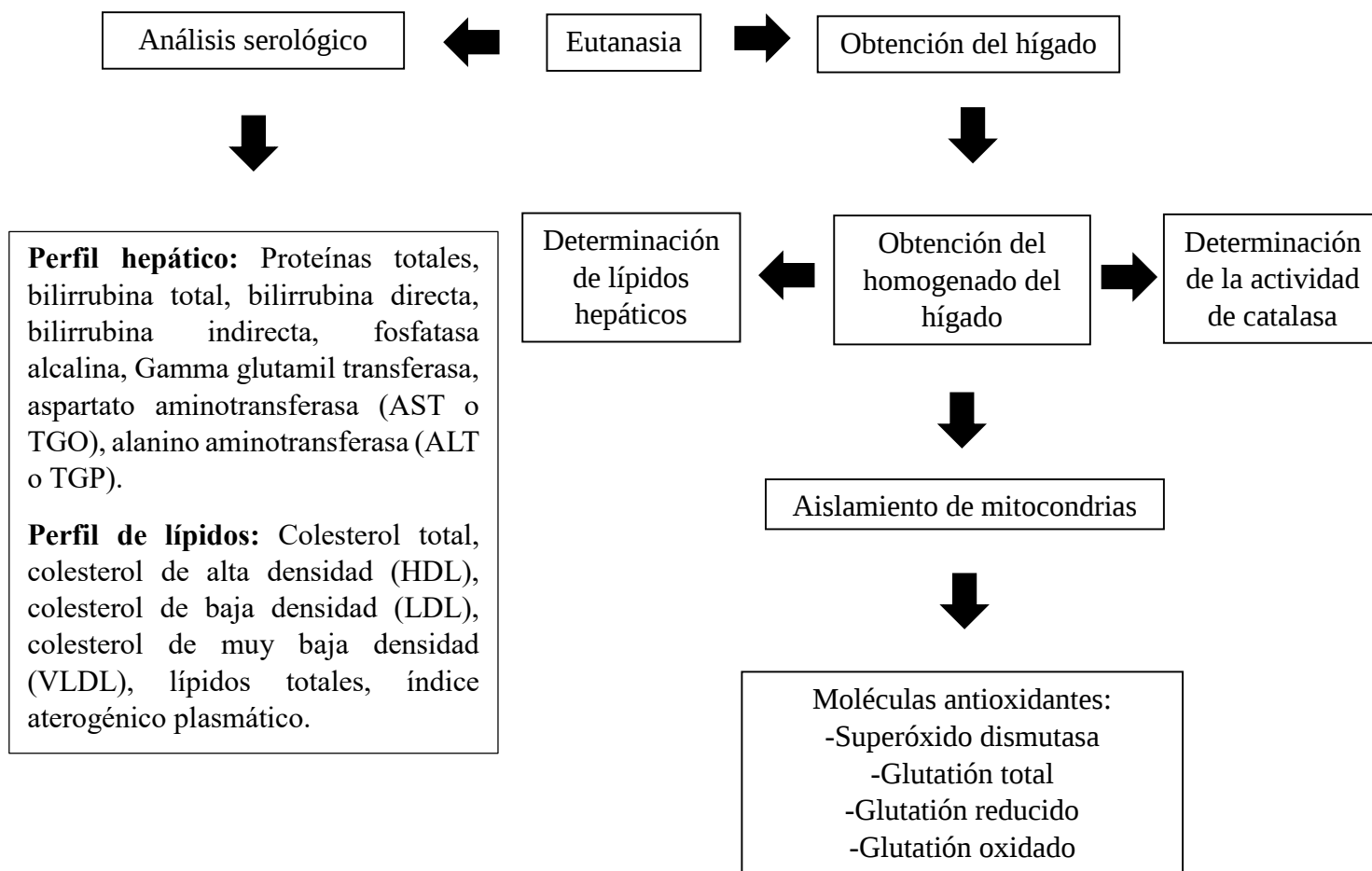


Administración oral diaria del extracto (80 mg/kg) por 60 días a los grupos 3, 4, 5 y 6
 Administración oral diaria de solución de biotina (2 mg/kg) por 30 días a los grupos 7 y 8
 Administración oral diaria del extracto (80 mg/Kg) por 60 días más biotina (2mg/Kg) por 30 días a
 los grupos 9, 10, 11 y 12



Determinación de peso al inicio y final de tratamiento
 Determinación de glucemia cada 6 días durante el tratamiento
 Determinación de triacilglicéridos a los 12, 36 y 60 días de tratamiento

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**



VII. RESULTADOS

VI.1. Capítulo 1: Actividad hipoglucémica, hipolipemiante y antioxidante de los compuestos del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera*, durante los periodos de primavera-verano y otoño-invierno en suero e hígado de ratas diabéticas

Resumen

La presente investigación se dirigió a estudiar el efecto de los compuestos presentes en el extracto de *J. spicigera* recolectado en dos diferentes temporadas del año en un modelo de ratas diabéticas inducidas mediante una dosis única de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (40 mg/kg). Se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 450-500 g, las cuales fueron divididas al azar en seis grupos que recibieron tratamiento durante un periodo de 60 días, de la siguiente manera: un grupo normoglucémico control (NC) y un grupo diabético control (DC) administrados únicamente con el vehículo (DMSO 1%), un grupo normoglucémico (NEPV) y un grupo diabético (DEPV) administrados con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de primavera – verano, un grupo normoglucémico (NEOI) y un grupo diabético (DEOI) administrados con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de otoño – invierno. Durante el tratamiento se determinó el peso y los niveles de glucemia y triacilglicéridos. Concluido el tratamiento, el hígado fue diseccionado y homogeneizado para determinar la concentración de lípidos hepáticos y la actividad de la enzima catalasa (CAT), posteriormente fueron extraídas las mitocondrias donde se llevó a cabo la determinación de la actividad del antioxidante enzimático superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). A partir de las muestras sanguíneas, se evaluó en suero las pruebas de perfil de lípidos y de función hepática. Los resultados obtenidos muestran un efecto hipoglucémico en el grupo DEPV y un efecto hipotriglicéridémico a los 60 días de tratamiento en los grupos DEPV y DEOI en suero e hígado. Se presentó una tendencia a disminuir los valores de colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL) e índice aterogénico plasmático (IAP) así como una disminución significativa en los parámetros de colesterol en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

y lípidos totales (LT) en los grupos DEPV y DEOI. Además, la administración del extracto recolectado durante la temporada de primavera – verano mostró una disminución significativa de las pruebas de función hepática como son fosfatasa alcalina (FA) y gamma glutamil transferasa (GGT), así como una tendencia a disminuir los valores de aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT). Por otro lado, la función enzimática de SOD y CAT mostraron un aumento significativo con la administración del extracto recolectado durante la temporada de primavera - verano y una tendencia a aumentar el porcentaje de GSH y disminuir el porcentaje de GSSG. Por lo que podemos concluir que el extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* presenta variaciones en la concentración de metabolitos secundarios de acuerdo a las condiciones ambientales. En el presente estudio se demostró que el extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano posee efecto hipoglucémico, hipolipemiante y antioxidante. Además, fue capaz de disminuir el daño hepático y la posible aparición de esteatosis hepática en la patología diabética. Por otro lado, el extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno únicamente ejerció efecto hipolipemiante, lo cual indica que posiblemente los compuestos responsables de disminuir el perfil lipídico en ratas diabéticas se encuentran indistintamente en ambas estaciones climáticas a los que fueron expuestos.

Palabras clave: Diabetes, *Justicia spicigera*, keampferitrin, estrés oxidativo, dislipidemia diabética

Abstract

The present investigation was directed to study the effect of the compounds present in the *J. spicigera* extract collected at different seasons of the year in a model of diabetic rats induced by a single dose of streptozotocin (STZ) intraperitoneally (40 mg / kg). 60 male rats of the Wistar strain weighing between 450-500 g were used, which were randomly divided into six groups that received treatment over a period of 60 days. A normoglycemic control (NC) group and a control diabetic group (DC) administered only with the vehicle (1% DMSO), A normoglycemic group (NEPV) and a diabetic group (DEPV) administered with the ethyl acetate extract of *Justicia spicigera* corresponding to the spring-summer period. A normoglycemic group (NEOI) and a diabetic group (DEOI) administered with the ethyl

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

acetate extract of *Justicia spicigera* corresponding to the autumn - winter period. During the treatment, the weight and the levels of glycemia and triacylglycerides were determined. After the treatment, the liver was dissected and homogenized to determine the concentration of liver lipids and the activity of the enzyme catalase (CAT), later the mitochondria were extracted where the activity of the enzyme antioxidant superoxide dismutase (SOD) was carried out) and levels of total glutathione, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). Lipid profile and liver function tests were evaluated in serum from blood samples. The results obtained show a hypoglycemic effect in the DEPV group and a hypotriglyceridemic effect at 60 days of treatment in the DEPV and DEOI groups in serum and liver. There was a tendency to decrease the values of cholesterol low-density lipoproteins (LDL) and plasma atherogenic index (IAP) as well as a significant decrease in the parameters of cholesterol very low-density lipoproteins (VLDL) and total lipids (LT) in the DEPV and DEOI groups. Furthermore, the administration of the extract collected during the spring-summer season showed a significant decrease in liver function tests such as alkaline phosphatase (FA) and gamma glutamyl transferase (GGT), as well as a tendency to decrease the values of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). On the other hand, the enzymatic function of SOD and CAT showed a significant increase with the administration of the extract collected during the spring-summer season and a tendency to increase the percentage of GSH and decrease the percentage of GSSG. Therefore, we can conclude that the ethyl acetate extract of *J. spicigera* presents variations in the concentration of secondary metabolites according to environmental conditions. In the present study it was shown that the extract obtained during the spring - summer season has a hypoglycemic, lipid lowering and antioxidant effect. In addition, it was able to decrease liver damage and the possible appearance of liver steatosis in diabetic pathology. On the other hand, the extract obtained during the autumn-winter season only exerted a lipid-lowering effect, which indicates that possibly the compounds responsible for reducing the lipid profile in diabetic rats are found indiscriminately in both climatic seasons to which they were exposed.

Key words: Diabetes, *Justicia spicigera*, keampferitrin, oxidative stress, diabetic dyslipidemia

Introducción

La diabetes es una enfermedad crónica grave que sobreviene cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no puede utilizar de manera eficaz la insulina que produce (OMS, 2016). Representa una de las mayores emergencias sanitarias mundiales del siglo XXI y se estima que existen alrededor de 425 millones de personas que padecen esta enfermedad, además se encuentra dentro de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial, significando junto con las otras tres principales enfermedades no transmisibles (ENT) (enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias) más del 80% de todas las muertes prematuras por ENT (FID, 2019).

A nivel mundial, México es el quinto país que presenta mayor número de diabéticos con 12.8 millones de personas que padecen esta enfermedad (FID, 2019) además, la diabetes es la primera causa de muerte en personas con más de 65 años de edad, a nivel nacional (INEGI, 2018), en su mayoría debido a las complicaciones desarrolladas en distintos órganos como los riñones, los ojos y en un grado muy importante el hígado, ya que ocasiona un aumento en los niveles de glucosa y ácidos grasos en la sangre, los cuales son almacenados en los hepatocitos (FundHepa, 2016) favoreciendo el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), incluidas sus manifestaciones más graves de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (El-Serag, 2004). Estas complicaciones se ha relacionado al aumento del estrés oxidativo causado por el incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Ames *et al.*, 1993), que pueden ser contrarrestadas por antioxidantes endógenos como las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) (Niki, 1999), así como por los antioxidantes exógenos y de origen vegetal como son los flavonoides y los taninos, ampliamente estudiados (Jiménez *et al.*, 2009) y que han demostrado tener propiedades hipoglucémicas (Andrade y Heinrich, 2005).

Justicia spicigera produce metabolitos secundarios del tipo fenólico, como taninos, lignanos y flavonoides (Martínez, 1996) como el kaempferitrin (Euler *et al.*, 1982) asimismo, terpenoides como el β -sitosterol, β -glucosil-O-sitosterol y la criptoxantina (caroteno)

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

(Domínguez *et al.*, 1990). Sin embargo, la concentración de flavonoides y de un gran número de compuestos polifenólicos presenta variaciones drásticas, tanto con factores ambientales como de manejo (García 2004), por lo que es de interés estudiar la actividad de los metabolitos secundarios producidos por *Justicia spicigera*, durante dos periodos del año en un modelo de diabetes crónica sobre el hígado de ratas inducidas con estreptozotocina.

Materiales y métodos

Identificación y recolección de *Justicia spicigera*

Las muestras de *Justicia spicigera* fueron colectadas en Morelia Michoacán, México (19°41'56"Norte y 101°13'43"Oeste) durante los periodos de abril – agosto de 2018 y noviembre de 2018 – febrero de 2019.

Preparación del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Justicia Spicigera*

El extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* fue obtenido mediante la maceración en frío (4°C) de la hoja con el solvente acetato de etilo en relación 1:10 (p/v) durante 10 días en la oscuridad; posteriormente fue filtrado y concentrado en un rotavapor a 55°C para conseguir el extracto en crudo que, finalmente se preparó a una concentración de 80 mg / mL disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%.

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (450-500 g) de 5 meses de edad, mantenidas en condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, alimentadas con una dieta estándar para roedores con presentación comercial de croquetas marca Nutricubos Purina® y agua purificada de acceso libre. La administración del extracto se realizó mediante el uso de una sonda orofaríngea durante 60 días, ajustando la dosis de acuerdo al peso corporal cada 6 días. Se siguieron los protocolos de cuidado y manejo de animales de experimentación expedido por la Secretaria de Agricultura (NOM-062-ZOO-1999) y la aprobación de este protocolo por el Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Inducción a la diabetes

La inducción a diabetes se realizó con previo ayuno de 16 horas, mediante una inyección de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (40 mg/kg) disuelto en buffer de citrato (pH 4.5). Los grupos control fueron administrados únicamente con buffer de citrato (vehículo); a los 10 días después de la inyección de la STZ se les midió la glucemia para confirmar la diabetes. Las ratas diabéticas que presentaron los niveles de glucemia >200 mg/dL se seleccionaron para el análisis.

Diseño experimental

Se dividieron al azar 60 ratas en 6 grupos que recibieron tratamiento durante un periodo de 60 días, de la siguiente manera: un grupo normoglucémico control (NC) y un grupo diabético control (DC) que fueron administrados únicamente con el vehículo (DMSO 1%), un grupo normoglucémico (NEPV) y un grupo diabético (DEPV) administrados con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de primavera – verano, un grupo normoglucémico (NEOI) y un grupo diabético (DEOI) administrados con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de otoño – invierno. Durante el tratamiento se determinó el peso y los niveles de glucemia y triacilglicéridos.

Grupo	Tratamiento
	60 días
NC	DMSO 1%
DC	
NEPV	Extracto
DEPV	
NEOI	
DEOI	

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Determinación de los niveles de peso, glucosa y triacilglicéridos

El peso corporal de las ratas de cada grupo se registró en gramos (g) al inicio y al final del tratamiento de 60 días. El porcentaje de ganancia de peso se determinó por la diferencia del peso final y el peso inicial en función del peso inicial multiplicado por 100.

$$\left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

La determinación de los niveles de glucemia y triacilglicéridos se realizaron de manera individual en cada uno de los animales después de un ayuno de 12 horas, posteriormente se hizo una punción en la vena caudal de la cola del animal con la ayuda de una lanceta metálica estéril para tomar una gota de sangre sobre una tirilla reactiva especial para cada determinación.

Los niveles de glucosa en sangre se determinaron cada 6 días después de iniciar con el tratamiento, utilizando el método de glucosa-oxidasa. Para esto se empleó un glucómetro (Accucheck Performa Roche). Mientras que la cuantificación de triacilglicéridos se llevó a cabo a los 12 y 36 días después de iniciar el tratamiento mediante el empleo de un equipo Accutrend Plus (Roche). El principio de medición se basa en la reflexión de la luz sobre la tira portarreactiva que contiene un sustrato cromógeno

Determinación del porcentaje de peso del hígado al final del tratamiento

Al finalizar el tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera*, las ratas fueron sacrificadas y el hígado fue diseccionado. El porcentaje de peso del hígado húmedo fue determinado en función del peso corporal de la siguiente manera:

$$\left(\frac{\text{Peso del hígado}}{\text{Peso corporal}} \right) \times 100$$

Obtención del suero sanguíneo

Concluidos los 60 días de tratamiento, las ratas fueron sometidas a eutanasia por decapitación, previo ayuno de 12 horas. Las muestras sanguíneas obtenidas fueron colocadas en tubos secos BD Vacutainer® para Suero con activador de coagulación, posteriormente se

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

centrifugaron a 7,500 rpm durante 10 minutos para obtener el suero al cual se le realizaron las pruebas de perfil de lípidos y de función hepática.

Determinación de los parámetros de perfil de lípidos

El perfil lipídico (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triacilglicéridos, lípidos totales e índice aterogénico) fue determinado en suero usando el equipo de química seca DRI-CHEM NX500i que utiliza placas de múltiples capas que cuantifican enzimas y productos químicos generales, utilizando un método colorimétrico.

Determinación de los parámetros de función hepática

Las pruebas de funcionamiento hepático o perfil hepático (PT, BT, BD, BI, FA, GGT, AST y ALT), se determinaron utilizando el equipo de química seca DRI-CHEM NX500i con el mismo fundamento que en las pruebas del perfil lipídico.

Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de hígado fueron aisladas empleando la técnica descrita por Saavedra-Molina y Devlin (1997). El hígado fue obtenido mediante una incisión en el abdomen y fue colocado en 25 mL de medio 1 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, EGTA 1 mM, pH7.4) a 4°C y fueron homogeneizados empleando un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón. El homogenado fue centrifugado a 2,000 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue centrifugado a 7,500 rpm por 10 min. El precipitado (fracción mitocondrial) fue resuspendido en 2 mL de medio 2 (sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, KH₂PO₄ 40 mM y EDTA 30 mM; pH 7.2) y centrifugado a 9,000 rpm por 10 minutos. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 1 mL de medio 2.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949). Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen empleado en la determinación de la actividad de catalasa (CAT) y los niveles de lípidos hepáticos en homogenado de hígado, así como la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), los

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

niveles de glutatión total (GLUT), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH) en mitocondrias de hígado.

Cuantificación de triacilglicéridos en hígado

La concentración de triacilglicéridos hepáticos se determinó en homogenado de hígado siguiendo el protocolo reportado por Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía (2012) con algunas modificaciones. Se tomó el equivalente a 20 µg de proteína por µl de la muestra. Posteriormente, a cada muestra se le añadió cbp 1 mL de solución PBS con tritón-X100 al 5%. Las muestras fueron sometidas en baño ultrasónico a 60° C durante 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13 300 rpm durante 15 min y se tomó el sobrenadante para determinar la concentración de triacilglicéridos de acuerdo al kit de ensayo comercial Spinreact (Sant Esteve de Bas, Spain).

Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

La actividad de la SOD fue determinada empleando un kit de análisis comercial (Sigma-Aldrich, USA), el cual permite analizar la actividad de la enzima mediante un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio Dojindo altamente soluble en agua, WST-1 (sal monosódica (2(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que produce un tinte formando cuando es reducida por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. Las lecturas fueron tomadas a 450 nm empleando un lector de micro placa Multiskan Go (Thermo Scientific).

Determinación de la actividad de la enzima catalasa en homogenado de hígado de rata

La actividad de CAT fue determinada por la cantidad del oxígeno disuelto usando un oxímetro. El método se basa en el principio de Clark. Se usan generalmente membranas de polietileno y fluorocarbono que son permeables al oxígeno molecular y relativamente robustas. Cuando el voltaje es aplicado el gas de oxígeno, presente en la electrólisis es reducido a un ion OH⁻, en el cátodo de platino. La corriente resultante es proporcional a la concentración de oxígeno molecular, esta puede transformarse fácilmente en unidades de

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

concentración por medios de varios procedimientos de calibración en mg de O₂ /L (**Mayari et al., 2005**). La determinación de catalasa se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante un periodo de tiempo, por lo que para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo (3 min) o la formación de burbujas debido a la liberación de oxígeno, es necesario usar una concentración de H₂O₂ (6mM) relativamente baja. Debido a una situación especial en catalasa, la temperatura de descomposición del H₂O₂ es pequeña, de manera que las mediciones se realizaron a una temperatura de 20 °C, en buffer de fosfatos a pH de 7.4.

Determinación de los niveles de glutatión total, reducido y oxidado en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas

La medición de niveles de glutatión total se realizó utilizando el método espectrofotométrico de Griffith (**1980**) modificado, basado en un ensayo cinético en que las cantidades catalíticas (nmoles) de glutatión reducido (GSH) provocan una reducción de 5,5'-Ditio-bis [ácido 2-nitrobenzoico (DTNB)] a ácido 5-tio-nitrobenzoico (TNB) que es detectado a 412 nm, después el glutatión oxidado (GSSG) formado se recicla en presencia de glutatión reductasa y NADPH. Los niveles de GSSG se determinaron por derivatización de GSH con vinilpiridina y por diferencia fueron calculados los niveles de GSH.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Resultados

Efecto del extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre el peso corporal, la glucosa y triacilglicéridos en ratas diabéticas

Los grupos diabéticos presentaron una disminución significativa de su peso corporal al final del tratamiento (figura 3) un síntoma característico en la patología diabética, mientras que los grupos normoglucémicos aumentaron de peso.

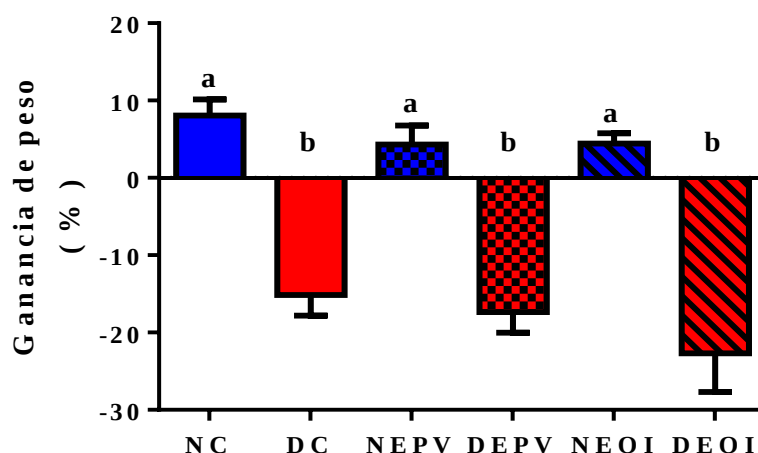


Figura 3. Porcentaje de ganancia de peso al final del tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba Anova y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

La inducción de la diabetes experimental fue confirmada por los niveles elevados de glucemia. En la figura 4 se presentan los resultados de glucemia obtenidos cada 6 días durante 60 días en cada uno de los grupos; los grupos normoglucémicos mantuvieron niveles de glucemia entre 67 y 79 mg/dL y los grupos diabéticos entre 300 y 400 mg/dL al inicio del tratamiento. Como se puede observar en la figura 4, ninguno de los grupos diabéticos tratados con extracto presentó modificaciones significativas los primeros 30 días de tratamiento en los niveles de glucemia al ser comparados con el grupo diabético control; sin embargo, el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano mostró una disminución significativa (317 mg/dL) desde los 36 días de tratamiento, en contraste con los grupos diabético control (493 mg/dL) y diabético tratado durante la temporada de otoño – invierno (443 mg/dL) hasta el final del tratamiento, donde el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano disminuyó los niveles de glucemia hasta 283 mg/dL.

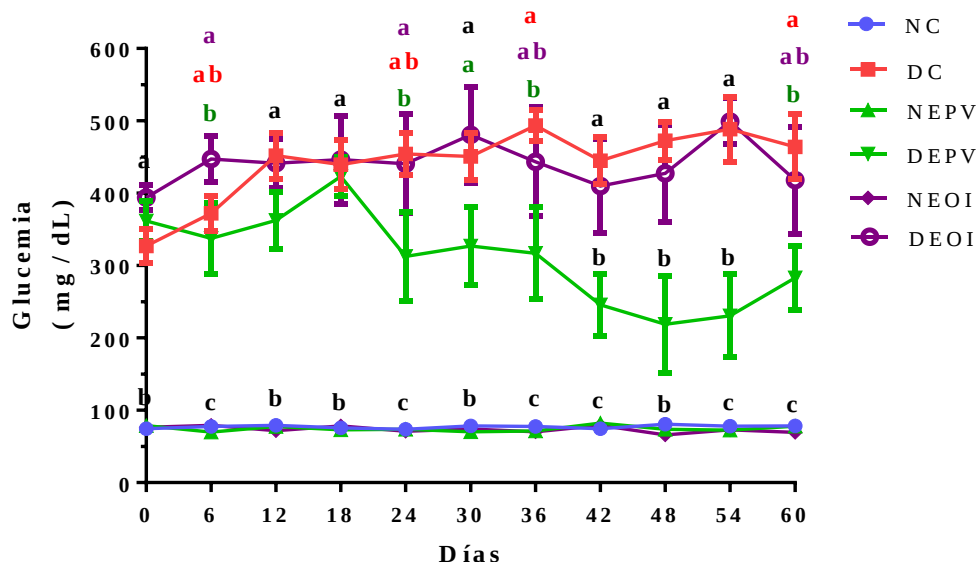


Figura 4. Niveles de glucemia obtenidos durante el tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera-verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

Con frecuencia, los pacientes diabéticos suelen presentar la aparición combinada de hiperglucemia y dislipidemia, por lo que fueron determinados los niveles de triacilglicéridos a los 12, 36 y 60 días de tratamiento (figura 5). A los 12 días ninguno de los grupos tratados (normoglucémicos y diabéticos administrados con extracto a 80mg/dL) mostró diferencias significativas al ser comparados con los grupos normoglucémico control y diabético control. Por otro lado, a los 36 días de tratamiento los grupos administrados con extracto presentaron una tendencia a disminuir los niveles de triacilglicéridos al ser comparados con el grupo diabético control (186 mg/dL). Sin embargo, a los 60 días de tratamiento se mostró una disminución significativa en los grupos diabéticos que recibieron el extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano (90 mg/dL) y la temporada de otoño – invierno (90 mg/dL) al ser comparados con el grupo diabético control (170 mg/dL). Los grupos normoglucémicos que recibieron el extracto no presentaron diferencias significativas con el grupo normoglucémico control durante el tratamiento de 60 días y con los grupos diabéticos administrados extracto a los 36 y 60 días de tratamiento.

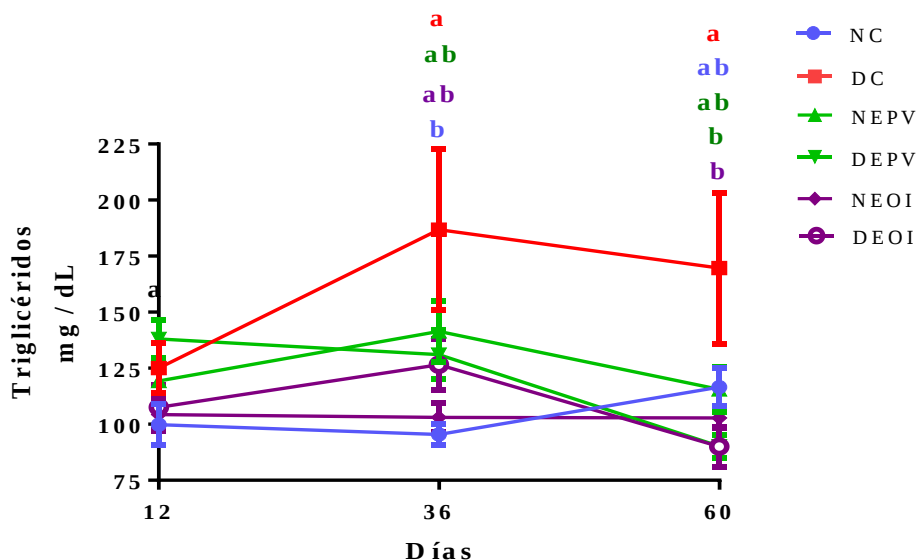


Figura 5. Niveles de triacilglicéridos obtenido durante el tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Efecto del extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre el peso del hígado y los niveles de triacilglicéridos hepáticos

El porcentaje de peso del hígado obtenidos al final del tratamiento fueron representados en la figura 6, donde podemos observar que los grupos diabéticos mostraron un aumento significativo del porcentaje de peso del hígado al ser comparado con los grupos normoglucémicos.

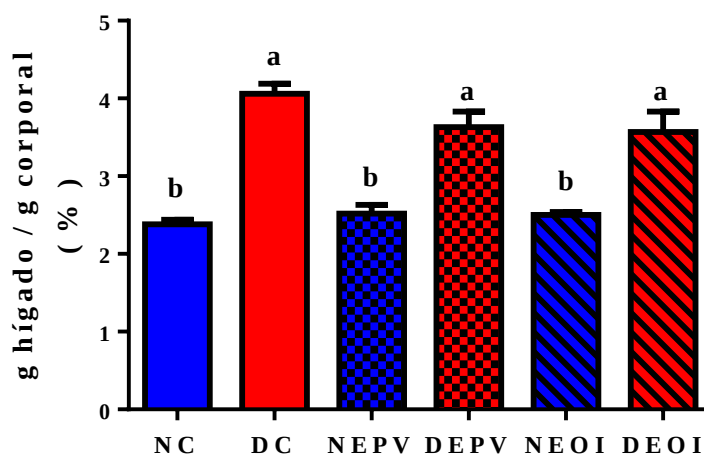


Figura 6. Porcentaje de peso del hígado obtenido al final del tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p<0.05$.

Los niveles de triacilglicéridos hepáticos obtenidos fueron representados en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Como se muestra en la figura 7 los grupos diabéticos tratados con extracto presentaron una disminución significativa en el contenido de triacilglicéridos al ser confrontado con el grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos que recibieron el tratamiento no presentaron diferencias significativas con los grupos normoglucémico control y diabéticos administrados con extracto.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

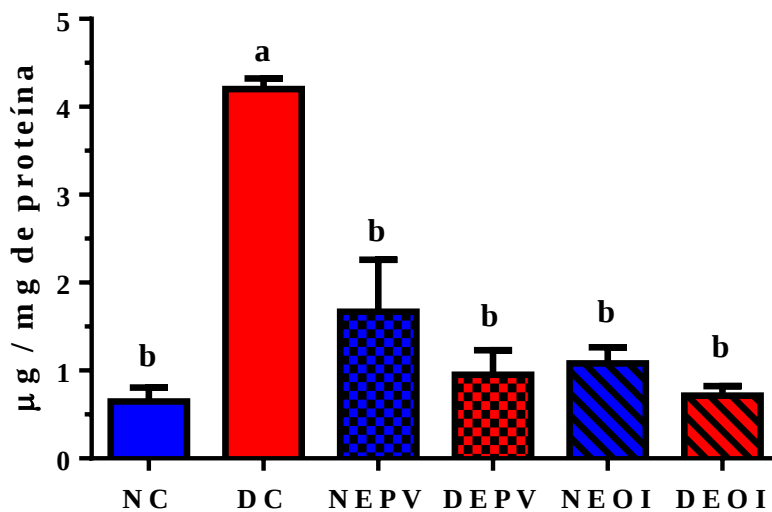


Figura 7. Niveles de triacilglicéridos hepáticos obtenido al final del tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba Anova y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

Efecto del extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre el perfil de lípidos en ratas diabéticas

El perfil de lípidos obtenido es representado en la tabla 3. Como podemos observar los valores de colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) no mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo diabético control. Sin embargo, el grupo diabético tratado con extracto de primavera – verano presento niveles significativamente menores al ser comparado con el grupo normoglucémico que recibió el mismo tratamiento, mientras que el grupo diabético tratado con extracto de otoño – invierno no exhibió diferencias significativas al ser confrontado con su grupo normoglucémico homólogo. Por otro lado, los valores obtenidos en la determinación del colesterol unido a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lípidos totales mostraron una disminución significativa en los grupos diabéticos tratados con extracto al ser comparados con el grupo diabético control. No obstante los resultados obtenidos en la determinación de HDL el índice aterogénico

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

plasmático presentó una tendencia a disminuir en los grupos diabéticos tratados con extracto al ser comparados con el grupo diabético control.

Tabla 3. Perfil de lípidos en suero al final del tratamiento con extracto de *Justicia spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno.

	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol de lipoproteína de alta densidad (mg/dL)	Colesterol de lipoproteína de baja densidad (mg/dL)
NC	71.40 ± 4.05 ^a	37.40 ± 1.81 ^a	34 ± 3.02 ^{ab}
DC	62.60 ± 1.86 ^b	31.80 ± 0.86 ^{ab}	30.80 ± 2.48 ^{ab}
NEPV	66.80 ± 2.01 ^{ab}	29.60 ± 1.96 ^b	37.20 ± 1.24 ^a
DEPV	49.40 ± 0.93 ^c	22.00 ± 0.95 ^c	27.40 ± 1.36 ^b
NEOI	59.25 ± 1.89 ^{bc}	27.50 ± 1.32 ^{bc}	31.75 ± 1.70 ^{ab}
DEOI	58.20 ± 2.52 ^{bc}	29.6 ± 1.44 ^b	28.60 ± 1.50 ^{ab}
	Colesterol de lipoproteína de muy baja densidad (mg/dL)	Lípidos totales (mg/dL)	Índice aterogénico plasmático
NC	23.32 ± 1.72 ^{ab}	338.40 ± 22.97 ^{ab}	0.49 ± 0.03 ^b
DC	33.93 ± 6.74 ^a	415.80 ± 63.80 ^a	0.71 ± 0.10 ^a
NEPV	23.10 ± 2.01 ^{ab}	328.95 ± 15.10 ^{ab}	0.58 ± 0.06 ^{ab}
DEPV	18.04 ± 1.04 ^b	251.28 ± 10.60 ^b	0.61 ± 0.04 ^{ab}
NEOI	20.55 ± 0.90 ^b	291.60 ± 8.69 ^b	0.57 ± 0.02 ^{ab}
DEOI	18.00 ± 1.78 ^b	266.76 ± 19.56 ^b	0.48 ± 0.03 ^b

N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Efecto del extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre los parámetros de función hepática en ratas diabéticas

Los resultados obtenidos en las pruebas de función hepática son representados en la tabla 4. Ninguno de los grupos presentó diferencias significativas en los parámetros correspondientes a los niveles de bilirrubina y proteínas totales. Sin embargo, los niveles de FA, GGT, AST y ALT aumentaron de manera significativa en el grupo diabético control al ser confrontado con los resultados obtenidos por el grupo normoglucémico control. Por otro lado, el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano presentó una disminución significativa en los niveles de las pruebas indicadoras de colestasis (FA y GGT) así como una tendencia a disminuir los niveles de las pruebas indicadoras de necrosis en hígado (AST y ALT), al ser comparado con los niveles obtenidos por el grupo diabético control mientras que, el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno no presentó diferencias significativas de los valores obtenidos en cada uno de los parámetros al ser comparados con los resultados que presentó el grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos que recibieron tratamiento no presentaron diferencias significativas con el grupo normoglucémico control.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Tabla 4. Pruebas de función hepática obtenido en suero al final del tratamiento con extracto de *Justicia spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno.

	Proteínas totales (g/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	Bilirrubina directa (mg/dL)	Bilirrubina indirecta (mg/dL)
NC	6.62 ± 0.19 ^a	0.28 ± 0.06 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.06 ^a
DC	6.08 ± 0.33 ^a	0.36 ± 0.05 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.05 ^a
NEPV	6.64 ± 0.19 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.04 ^a
DEPV	6.52 ± 0.23 ^a	0.28 ± 0.04 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.04 ^a
NEOI	6.74 ± 0.42 ^a	0.28 ± 0.02 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.02 ^a
DEOI	6.22 ± 0.27 ^a	0.3 ± 0.04 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.04 ^a
	Fosfatasa alcalina (U/L)	Gamma Glutamil transferasa (U/L)	Aspartato aminotransferasa (U/L)	Alanino aminotransferasa (U/L)
NC	146.75 ± 16.30 ^c	2.00 ± 0.45 ^{cd}	260.40 ± 24.15 ^c	79.00 ± 5.66 ^b
DC	1182.40 ± 0.60 ^a	15.40 ± 2.40 ^{ab}	789.20 ± 106.93 ^a	504.80 ± 84.87 ^a
NEPV	141.50 ± 14.09 ^c	0.97 ± 0.02 ^d	373.40 ± 54.07 ^{bc}	98.40 ± 14.83 ^b
DEPV	985.25 ± 47.90 ^b	9.00 ± 2.17 ^{bc}	602.00 ± 99.58 ^{ab}	287.60 ± 72.96 ^{ab}
NEOI	118.50 ± 16.38 ^c	1.60 ± 0.24 ^d	297.00 ± 22.46 ^{bc}	77.20 ± 4.40 ^b
DEOI	1157.00 ± 26.00 ^a	18.00 ± 2.35 ^a	841.40 ± 97.73 ^a	408.00 ± 69.26 ^a

N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

Efecto del extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en hígado de ratas diabéticas.

La actividad de la enzima SOD2 fue representada en U*mg de proteína como se muestra en la figura 8, donde podemos observar que la actividad de la enzima exhibió un aumento en los grupos diabéticos administrados con extracto en contraste con el grupo diabético control. Los

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

grupos normoglucémicos y diabéticos tratados con extracto no presentaron diferencias significativas al ser confrontados con el grupo normoglucémico control.

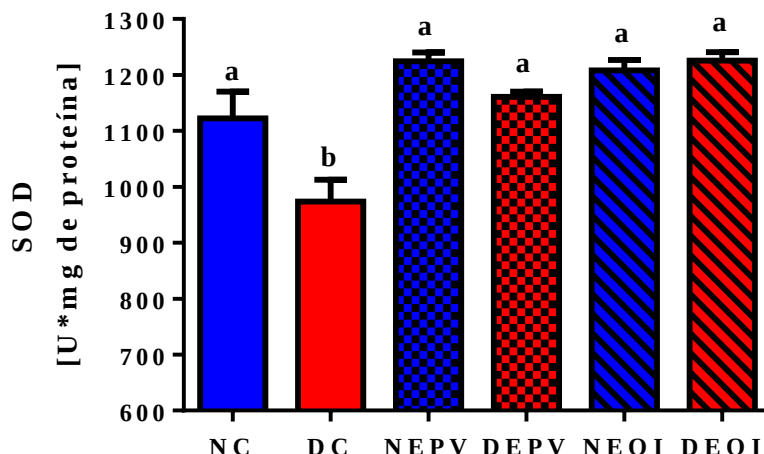


Figura 8. Actividad de la enzima SOD en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Los niveles de la actividad de la enzima catalasa son representados en U*mg de proteína como se muestra en la figura 9, donde se presentó una disminución significativa en el grupo diabético control en contraste con el grupo normoglucémico control. Por otro lado, los grupos normoglucémico y diabético administrados con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano presentaron un aumento significativo al ser comparados con los grupos normoglucémico y diabético control mientras que, los grupos normoglucémico y diabético administrados con extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno no presentaron diferencias significativas al ser comparados con los grupos normoglucémico y diabético control. El grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno no presentó diferencias significativas al ser confrontado con su grupo normoglucémico homólogo.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

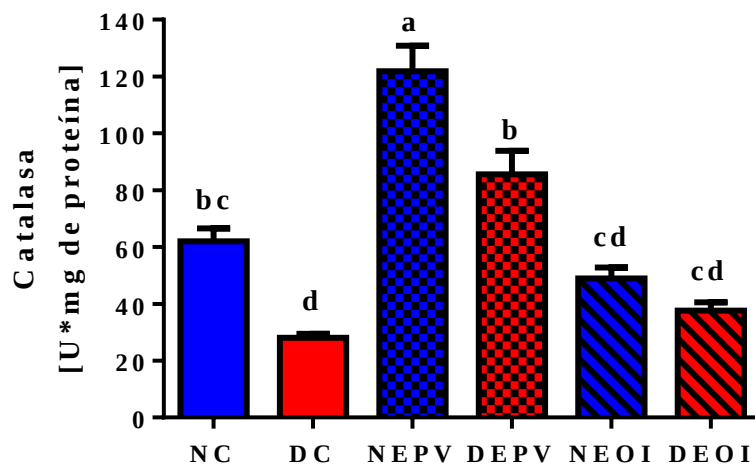


Figura 9. Actividad de la enzima CAT en homogenado de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

Efecto del extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre los niveles de glutatión en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

Los niveles de glutatión total fueron representados en $\mu\text{moles/mg}$ de proteína (Figura 10). Como podemos observar los valores obtenidos de los grupos diabéticos fueron significativamente menores a los valores presentados por los grupos normoglucémicos. Sin embargo, el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano no presentó diferencias significativas en el porcentaje de glutatión reducido [(GSH) figura 11] y el porcentaje de glutatión oxidado [GSSG) figura 12] al ser comparado con el grupo normoglucémico que recibió el mismo tratamiento y mostró una tendencia a aumentar el porcentaje de GSH y a disminuir el GSSG al ser comparado con el grupo diabético control, mientras que, el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno no presentó diferencias significativas en los valores obtenidos de GSH y GSSG al ser confrontado con el grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos tratados y normoglucémico control no presentaron diferencias

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

significativas entre ellos. De acuerdo a los resultados obtenidos la relación de GSH sobre el GSSG presento una tendencia a aumentar en el grupo diabético administrado con extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano al ser confrontado con el grupo diabético control (figura 13).

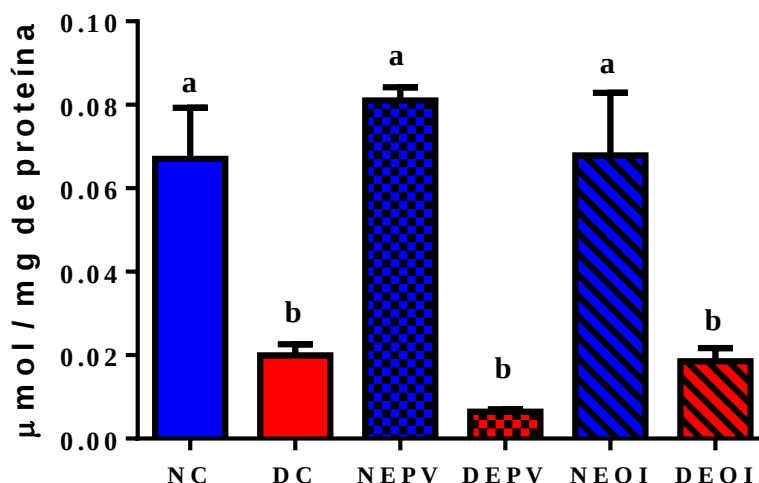


Figura 10. Niveles de glutatión en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

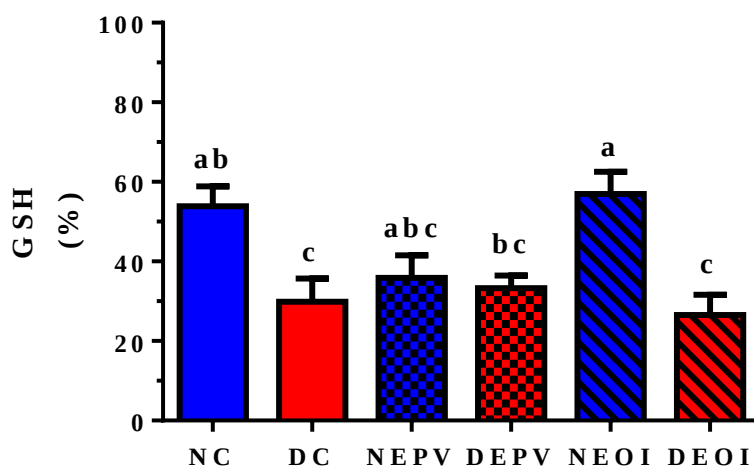


Figura 11. Porcentaje de glutatión reducido en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

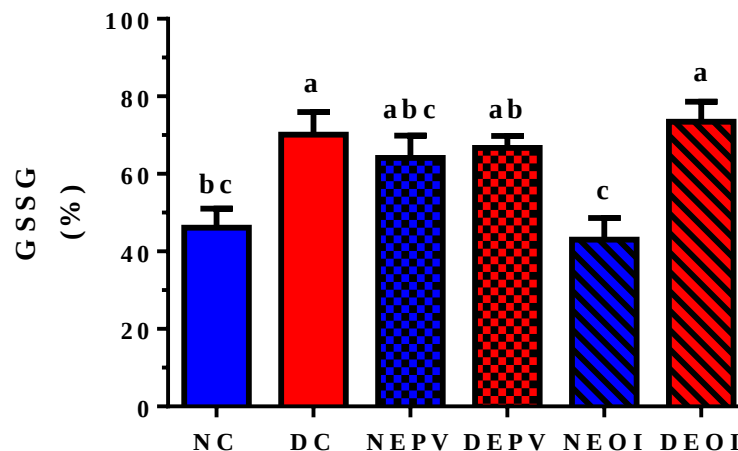


Figura 12. Porcentaje de glutatión oxidado en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

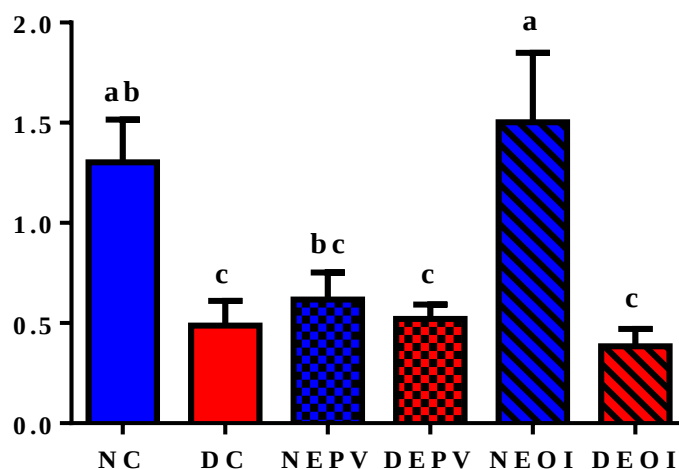


Figura 13. Relación de GSH/ GSSG en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. EPV: extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. EOI: extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$.

VII.1.1 Discusión

Las terapias convencionales para la diabetes tienen muchas deficiencias, como efectos adversos y una alta pérdida en la tasa de eficacia con el tiempo también conocido como

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

fracaso secundario. Por otro lado, se ha propuesto que los extractos de hierbas tengan una eficacia similar sin efectos secundarios como la de los medicamentos convencionales (Sharma *et al*, 2008). Los metabolitos secundarios presentes en plantas con propiedades hipoglucémicas pertenecen a los grupos: terpenos, carotenoides, alcaloides, esteroides, taninos, polisacáridos, cumarinas, esteroides, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). En particular, los flavonoides son considerados como agentes antidiabéticos potenciales porque ejercen múltiples acciones que son tanto hipoglucémicas (acción insulinomimética) como antihiperoglucémicas (secretagogo de insulina) (Cazarolli *et.al*, 2008). Estudios anteriores han demostrado que *J. spicigera* produce metabolitos secundarios de tipo fenólico, como taninos, lignanos y flavonoides (Martínez, 1996) como el kaempferitrin (kaempferol-3,7-O-dir- dirhamnosido) (Euler *et al.*, 1982). Asimismo, Ortiz-Andrade *et al.*, en 2012 demostraron que el kaempferitrim era el compuesto más abundante presente en el extracto etanólico de *J. spicigera*, por lo que atribuyeron los efectos antidiabéticos del extracto a la presencia de este compuesto. Por otro lado, la síntesis de los metabolitos secundarios responde a factores ambientales, cambios estacionales y condiciones externas como la luz, la temperatura y la humedad (Morison y Lawlor, 1999). Además, se ha demostrado un aumento en la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas como respuesta a altas y bajas temperaturas (Verma y Shukla, 2015), de modo que la presente investigación se dirige a estudiar el efecto de los compuestos presentes de *J. spicigera* recolectado en diferentes temporadas del año en un modelo de ratas diabéticas inducidas con STZ.

La diabetes inducida por STZ se caracteriza por una pérdida severa en el peso corporal (Symeonidis *et al*, 2009). La disminución del peso corporal en los grupos diabéticos (figura 3) podría deberse a la deshidratación y al catabolismo de las grasas y las proteínas (Hakim *et al*, 1997), así como al aumento de las reacciones catabólicas que conducen a la pérdida de masa muscular (Rajkumar *et al.*, 1991). Por otro lado, el efecto hipoglucémico ejercido por el extracto (figura 4) infiere variaciones en la concentración de metabolitos secundarios presentes en *J. spicigera* de acuerdo a las estaciones del año, probablemente atribuido a una mayor concentración de kaempferitrin durante la temporada de primavera – verano.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Tzeng *et al.* (2009) demostraron que el kaempferitrin estimula las vías de transducción de señalización de insulina clásicas en las células 3T3-L1: fosforilación del receptor de insulina, sustrato receptor de insulina 1 y otras proteínas reguladoras intracelulares, lo que aumenta la translocación de GLUT-4, responsable de la absorción de glucosa en casos sensibles a la insulina (Huang, 2007), aumentando así la captación de glucosa en los tejidos periféricos (Jorge *et al.*, 2004). Además, es posible, que el tratamiento con STZ no destruya una cantidad mínima de células β pancreáticas (Lü *et al.*, 2009) favoreciendo el efecto del kaempferitrin en la disminución de la glucosa en sangre.

En la patología diabética, el bajo nivel de insulina aumenta las concentraciones de colesterol total, triacilglicéridos y el peso del hígado debido a la lipólisis en el tejido adiposo que incrementa los ácidos grasos libres hacia el hígado desde el tejido adiposo y secretados posteriormente desde el hígado como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Garg y Grundy, 1990; Bierman, 1992). Nuestro estudio demostró que el extracto de *J. spicigera* obtenido durante ambas temporadas presentó compuestos con actividad hipolipemiente al disminuir los niveles séricos de TG desde los 36 días de tratamiento (figura 5) y de colesterol total, colesterol VLDL y lípidos totales a los 60 días de tratamiento en ratas diabéticas (Tabla 3). Estos resultados podrían estar relacionados a la presencia de terpenoides como el β -sitosterol que ha sido reportado en hojas de *J. spicigera* (Domínguez *et al.*, 1990). El β -sitosterol es un esterol que se encuentra en casi todas las plantas conocidas como fitosteroles que son muy similares en composición al colesterol (Rakel, 2017). Aunque el mecanismo de reducción de colesterol de los fitoesteroles no se comprende completamente, parecen inhibir la absorción intestinal de colesterol compitiendo contra el para su incorporación en micelas mixtas u obstaculizar la esterificación del colesterol en las células de la mucosa intestinal (Heinemann *et al.*, 1991). En un estudio realizado por Liang *et al.*, en 2011 se descubrió que el β -sitosterol era efectivo para reducir el colesterol total, la relación de colesterol LDL/ HDL y triacilglicéridos en plasma. También informaron que la actividad reductora del colesterol por el β -sitosterol se asoció con una baja regulación de la acil-CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT) y de la proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos (MTTP). La ACAT es una enzima reguladora del colesterol involucrada en la esterificación y absorción del colesterol, la captación de LDL hepático y la acumulación de colesterol en la pared arterial

(Suckling y Stange, 1985). Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran una disminución del índice aterogénico plasmático (IAP) en ratas diabéticas tratadas (Tabla 3), evitando la posible acumulación de colesterol en las arterias. Por otra parte, estudios en animales y humanos (Raabe *et al.*, 1999; Chandler *et al.*, 2003) han demostrado que la inhibición de MTTP bloquea la secreción hepática de VLDL de modo que podría evitar el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Adiels *et al.*, 2008), lo anterior explica la disminución significativa en los niveles de colesterol unido a VLDL en suero (tabla 3) y TG hepáticos (figura 7) obtenidos en ratas diabéticas tratadas con extracto.

El daño hepático es una complicación grave en la DM (Mohamed *et al.*, 2016). La enfermedad hepática crónica más común observada en pacientes con DM es la enfermedad del HGNA (Amarapurkar, 2002) que generalmente confiere un pronóstico benigno. Sin embargo, también puede presentarse esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (El-Serag, 2004). La esteatohepatitis o la infiltración de grasa al hígado, puede ser la causa más común de elevaciones de las enzimas hepáticas (Reid, 2001) incluidas AST, ALT y FA en plasma, principalmente debido a la fuga de estas enzimas del citosol hepático al torrente sanguíneo (Concepción Navarro *et al.*, 1993). La elevación de la actividad sérica de la AST generalmente se acompaña de otras alteraciones y refleja necrosis hepatocelular. La ALT es una enzima citosólica que se encuentra mayormente en los hepatocitos lo que le otorga una mayor especificidad que la AST. Su significado es básicamente el mismo que esta última, es decir, se eleva marcadamente en fenómenos de necrosis celular aguda y en menor grado cuando existe un proceso crónico destructivo de los hepatocitos (Biel *et al.*, 2015) como se observó en el grupo diabético control (Tabla 4). En el caso de una colestasis intrahepática focal, la fosfatasa alcalina se incrementa por inducción de la misma colestasis pero la bilirrubina se mantiene dentro de los límites normales, esto debido a que solo un 10% del tejido hepático es capaz de mantener concentraciones de bilirrubina normales en el suero (Burke, 1975). Por otro lado, la elevación de gamma-glutamyl-transferasa es usada para confirmar el origen específico proveniente del hígado (Whitfield *et al.*, 1972). En nuestro estudio, el grupo diabético control presento niveles elevados de FA y GGT pero se mantuvo dentro de los niveles normales en cada uno de los parámetros de bilirrubina (Tabla 4). De acuerdo a lo anterior los resultados obtenidos en

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

nuestro estudio indican colestasis intrahéptica y una posible esteatosis o esteatohepatitis no alcohólica en el grupo diabético control y una tendencia a disminuir los valores de AST, ALT, FA y GGT (Tabla 4) en ratas diabéticas tratadas con extracto obtenido durante la temporada de primavera- verano.

Aunque los mecanismos en el desarrollo y la progresión de las enfermedades hepáticas crónicas en la diabetes siguen siendo poco conocidos, la contribución del estrés oxidativo parece obvia. La hiperglucemia en ratas diabéticas inducidas por STZ evoca el estrés oxidativo a través de una variedad de mecanismos que eventualmente resulta en una disfunción de varios órganos y tejidos a través de la producción de ERO como el oxígeno activo y los radicales libres (**Baskol *et al.*, 2007; Francés *et al.*, 2011**). Los antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GPx y GR) forman la primera línea del mecanismo de defensa antioxidante para proteger al organismo del daño oxidativo mediado por ERO (**Nonaka *et al.*, 1991**). Aunque no hay consenso sobre los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes de diferentes órganos en ratas diabéticas, algunos estudios que miden las actividades de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa en diabetes mellitus reportaron reducciones en los niveles de estas enzimas (**Şekeroğlu *et al.*, 2000; Coskun *et al.*, 2005; Özkaya *et al.*, 2008**). Estos mismos resultados fueron observados en nuestro estudio, donde los niveles de actividad presentados por la enzima SOD-2 (figura 8) fueron significativamente inferiores en el grupo diabético control y aumentaron en los grupos diabéticos administrados con extracto obtenido durante ambas temporadas. Por otra parte, el grupo administrado durante la temporada de primavera verano presento un aumento significativo de la actividad de la enzima CAT (figura 9) y los niveles de GSH (figura 11) en comparación al grupo diabético control. Estos resultados también pueden relacionarse a la concentración de kaempferitrin presente principalmente en el extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano, ya que los flavonoides pueden depurar los radicales libres (**Jovanovic *et al.*, 1998**) de acuerdo a las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos (**Pérez, 2003**).

VII.1.2. Conclusiones

Los datos reportados en el presente estudio mostraron variaciones en la concentración de metabolitos secundarios del extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* de acuerdo a las

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

condiciones ambientales. El extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano demostró un efecto hipoglucémico, hipolipemiante y antioxidante además, fue capaz de disminuir el daño hepático y la posible aparición de esteatosis hepática en la patología diabética. Por otro lado, el extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno únicamente ejerció efecto hipolipemiante, lo cual indicó que posiblemente los compuestos responsables de disminuir el perfil lipídico en ratas diabéticas se encontraron indistintamente en ambas estaciones climáticas a los que fueron expuestos.

VI.1.3. Referencias

Adiels, M., Taskinen, M. R., & Borén, J. (2008). Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Current Diabetes Reports*, 8(1), 60.

Amarapurkar, D., & Das, H. S. (2002). Chronic liver disease in diabetes mellitus. *Tropical Gastroenterology: official journal of the Digestive Diseases Foundation*, 23(1), 3-5.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.

Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 99(3), 325-348.

Baskol, G., Baskol, M., & Kocer, D. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical Biochemistry*, 40(11), 776-780.

Biel, F., BERNARDIN, D. M., & GALLEGOS, F. (2015). Interpretación de exámenes de laboratorio hepático y aproximación diagnóstica en pacientes con pruebas alteradas. *Recuperado Julio*, 19.

Bierman, E. L. (1992). George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arteriosclerosis and Thrombosis: Journal of Vascular Biology*, 12(6), 647-656.

Burke, M. D. (1975). Liver function. *Human Pathology*, 6(3), 273-286.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, R. B., Santos, M., Folador, P., ... & Mena Barreto Silva, F. R. (2008). Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(10), 1032-1038.

Chandler, C. E., Wilder, D. E., Pettini, J. L., Savoy, Y. E., Petras, S. F., Chang, G., ... & Harwood, H. J. (2003). CP-346086 an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *Journal of Lipid Research*, 44(10), 1887-1901.

Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*, 51(2), 117-123.

Domínguez, X. A., Achenbach, H., González, C., & Ferré-D'Amare, A. R. (1990). Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). *Rev Latinoamer Quím*, 21, 142-143.

El-serag, H. B., Tran, T., & Everhart, J. E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 126(2), 460-468.

Euler, K. L., & Alam, M. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45(2), 220-221.

Federación Internacional de Diabetes. (2019) *Atlas de la Diabetes de la FID*, 9ª edición. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes.

Francés, D. E., Ronco, M. T., Ingaramo, P. I., Monti, J. A., Pisani, G. B., Parody, J. P., ... & Carnovale, C. E. (2011). Role of reactive oxygen species in the early stages of liver regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radical Research*, 45(10), 1143-1153.

Fundación Mexicana para la salud hepática. (2016). El hígado y la diabetes. 22. Recuperado de: <https://www.fundhepa.org.mx/Informativo.html>

García, D. E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y forrajes*, 27(2).

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Garg, A., & Grundy, S. M. (1990). Management of dyslipidemia in NIDDM. *Diabetes care*, 13(2), 153-169.
- Gornall A G, Bardawill G J y David M M. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J Biol. Chem.* 177: 751-760.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207-212.
- Hakim, Z. S., Patel, B. K., & Goyal, R. K. (1997). Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 41(4), 353-360.
- Heinemann, T., Kullak-Ublick, G. A., Pietruck, B., & Von Bergmann, K. (1991). Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 40(1), S59-S63.
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237-252.
- Instituto Nacional de Estadística y geografía. (2018). Características de las defunciones registradas en México durante 2017 (525/18). Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-5.
- Jorge, A. P., Horst, H., de Sousa, E., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, 149(2-3), 89-96.
- Jovanovic, S. V. S. S. (1997). Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoids in Health and Disease*, 137-161.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2011). Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219(1), 124-133.
- Lü, H., Chen, J., Li, W. L., Ren, B. R., Wu, J. L., & Zhang, H. Q. (2009). Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from Folium Eriobotryae. *Phytomedicine*, 16(10), 967-971.
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-5.
- Mohamed, J., Nafizah, A. N., Zariyantey, A. H., & 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.
- Morison, J. I. L., & Lawlor, D. W. (1999). Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell & Environment*, 22(6), 659-682.
- Navarro, M. C., Montilla, M. P., Martín, A., Jiménez, J., & Utrilla, M. P. (1993). Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus tomentosus. *Planta Medica*, 59(04), 312-314.
- Navarro, R. M., Lloréns, M. D. C. E., & Ruiz, J. G. M. (2005). Validación de La Determinación de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas y Aguas Residuales. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 36().
- Niki, E. (1999). Action of antioxidants against oxidative stress. In *Advances in DNA damage and repair* (pp. 313-318). Springer, Boston, MA.
- Nonaka, A., Manabe, T., & Tobe, T. (1991). Effect of a new synthetic ascorbic acid derivative as a free radical scavenger on the development of acute pancreatitis in mice. *Gut*, 32(5), 528-532.
- Nordlie, R. C., Foster, J. D., & Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual review of nutrition*, 19(1), 379-406.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario oficial de la federación, 22 de agosto de 2001. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Informe mundial sobre la diabetes. Recuperado de: <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>

Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., ... & García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 455-462.

Özkaya, Y. G., Ag, A., Yargıçog, P., Hacıoglu, G., Bilmen-Sarikçiog, S., Özen, I., & Alicigüzel, Y. (2008). The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats.

Pérez-Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.

Raabe, M., Véniant, M. M., Sullivan, M. A., Zlot, C. H., Björkegren, J., Nielsen, L. B., ... & Young, S. G. (1999). Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(9), 1287-1298.

Rajkumar, L., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., & Govindarajulu, P. (1991). Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian journal of experimental biology*, 29(11), 1081-1083.

Rakel, D. (2017). *Integrative medicine-E-book*. Elsevier health sciences.

Reid, A. E. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 121(3), 710-723.

Saavedra-Molina, A. y Devlin, T.M. (1997). Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis in rat liver. *Amino Acids*. 12(3-4), 293-298.

Şekeroğlu, M. R., Sahin, H., Dülger, H., & Algün, E. (2000). The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry*, 33(8), 669-674.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Sharma, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2008). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2376-2383.
- Suckling, K. E., & Stange, E. F. (1985). Role of acyl-CoA, cholesterol acyl-transferase in cellular cholesterol metabolism. *Journal of Lipid Research*, 26, 647–671.
- Symeonidis, T., Chamilos, M., Hadjipavlou-Litina, D. J., Kallitsakis, M., & Litinas, K. E. (2009). Synthesis of hydroxycoumarins and hydroxybenzo [f]-or [h] coumarins as lipid peroxidation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(4), 1139-1142.
- Tzeng, Y. M., Chen, K., Rao, Y. K., & Lee, M. J. (2009). Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*, 607(1-3), 27-34.
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Whitfield, J. B., Pounder, R. E., Neale, G., & Moss, D. W. (1972). Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gut*, 13(9), 702-708.

VII. 2. Capítulo 2. Efecto sinérgico de la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y biotina en hígado de ratas diabéticas

Resumen

La diabetes es una enfermedad crónica degenerativa que puede ser asociada con complicaciones relacionadas con el hígado. La presente investigación se dirigió a estudiar el efecto sinérgico de la biotina y de los compuestos presentes de *J. spicigera* en un modelo de ratas diabéticas inducidas mediante una inyección de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (40 mg/kg). Se dividieron al azar 80 ratas en 8 grupos de la siguiente manera: un grupo normoglucémico control (NC) y un grupo diabético control (DC) administrados durante 60 días con DMSO 1%, un grupo normoglucémico (NB) y un grupo diabético administrados durante 30 días con biotina (DB), un grupo normoglucémico (NEPVB) y un grupo diabético (DEPVB) administrados durante 60 días con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de primavera – verano y por 30 días con biotina, un grupo normoglucémico (NEOIB) y un grupo diabético (DEOIB) administrados durante 60 días con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de otoño – invierno y por 30 días con biotina. Concluido el tratamiento, el hígado fue diseccionado y homogeneizado para determinar lípidos hepáticos y la actividad de la enzima catalasa (CAT), posteriormente fueron extraídas las mitocondrias donde se llevó a cabo la determinación del antioxidante enzimático superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). A partir de las muestras sanguíneas, se evaluó en suero las pruebas de perfil de lípidos y de función hepática. Los resultados obtenidos no mostraron efecto hipoglucémico. Sin embargo, se presentó un efecto hipotriglicéridémico en suero desde los 6 días de tratamiento y en hígado al final del tratamiento con biotina al ser administrado de manera individual y combinado. Además, se presentó una tendencia a disminuir los valores de IAP, así como disminución significativa en la concentración de colesterol unido a VLDL y LT en los grupos DB, DEBPV y DEBOI. Por otro lado, la administración de la biotina combinada con el extracto recolectado durante la temporada de primavera – verano mostró una disminución significativa en la concentración

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

de las enzimas hepáticas FA y GGT y una tendencia a disminuir la concentración de AST y ALT en los grupos DB, DEBPV y DEBOI. La actividad enzimática de SOD y CAT mostraron un aumento significativo en los grupos DEBPV y DEBOI y una tendencia a aumentar el porcentaje de GSH y disminuir del porcentaje de GSSG en los grupos DB y DEBPV. Por lo que podemos concluir que el tratamiento combinado de biotina con extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera – verano presenta un efecto hipolipemiente y antioxidante significativo en hígado de ratas diabéticas, lo cual podría estar relacionado a los efectos que biotina y los componentes del extracto presentan de manera individual, convirtiéndose en un potencial tratamiento para evitar la dislipidemia diabética y la aparición de hepatopatías de personas que padecen diabetes mellitus.

Palabras clave: Diabetes, *Justicia spicigera*, biotina, hígado y diabetes, estrés oxidativo, dislipidemia diabética.

Abstract

Diabetes is a chronic degenerative disease that can be associated with complications related to the liver. The present investigation was directed to study the synergistic effect of biotin and the present compounds of *J. spicigera* in a model of diabetic rats induced by an injection of streptozotocin (STZ) intraperitoneally (40 mg / kg). 80 rats were randomly divided into 8 groups. A control normoglycemic group (NC) and a control diabetic group (DC) administered for 60 days with 1% DMSO. A normoglycemic group (NB) and a diabetic group administered during 30 days with biotin (DB). A normoglycemic group (NEPVB) and a diabetic group (DEPVB) administered for 60 days with the ethyl acetate extract of *J. spicigera* corresponding to the spring-summer period and for 30 days with biotin. A normoglycemic group (NEOIB) and a diabetic group (DEOIB) administered for 60 days with the ethyl acetate extract of *J. spicigera* corresponding to the autumn-winter period and for 30 days with biotin. After the treatment, the liver was dissected and homogenized to determine liver lipids and the activity of the enzyme catalase (CAT), later the mitochondria where the determination of the enzyme antioxidant superoxide dismutase (SOD) and glutathione levels were carried out. Total, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). Lipid profile and liver function tests were evaluated in serum from blood samples. The results

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

obtained did not show a hypoglycemic effect. However, there was a hypotriglyceridemic effect in serum from 6 days of treatment and in liver at the end of biotin treatment when administered individually and in combination. In addition, there was a tendency to decrease the IAP values, as well as a significant decrease in the concentration of VLDLc and LT in the DB, DEBPV and DEBOI groups. On the other hand, the administration of biotin combined with the extract collected during the spring-summer season showed a significant decrease in the concentration of the liver enzymes FA and GGT and a tendency to decrease the concentration of AST and ALT in the DB groups., (DEBPV and DEBOI). The enzymatic activity of SOD and CAT showed a significant increase in the DEBPV and DEBOI groups and a tendency to increase the percentage of GSH and decrease in the percentage of GSSG in the DB and DEBPV groups. Therefore, we can conclude that the combined treatment of biotin with *J. spicigera* extract obtained during the spring-summer season has a significant lipid-lowering and antioxidant effect on the liver of diabetic rats. Which could be related to the effects that biotin and components of the extract present individually, becoming a potential treatment to prevent diabetic dyslipidemia and the appearance of liver disease in people with diabetes mellitus.

Key words: Diabetes, *Justicia spicigera*, biotin, liver and diabetes, oxidative stress, diabetic dyslipidemia.

Introducción

La diabetes es un problema global y se espera que la epidemia continúe. Se estima que alrededor de 463 millones de personas en todo el mundo padecen diabetes y que para el año 2045 esta cifra aumente a 700 millones de personas entre 18 y 99 años (**FID, 2019**).

La diabetes se puede asociar con complicaciones que pueden dar lugar a alteraciones importantes, que provocan disfunción y fallo de varios órganos: en especial, ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (**Mediavilla, 2001**) no obstante, las complicaciones relacionadas con el hígado ocurren con frecuencia y a menudo no se reconocen (**Harrison, 2006**).

El hígado juega un papel importante en la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa. Se ha estimado que del 30% al 60% de toda la glucosa absorbida en el tracto gastrointestinal se somete a un procesamiento hepático con almacenamiento posterior como

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

glucógeno (Ferranini *et al.*, 1985; Baig *et al.*, 2001). La insulina favorece la síntesis de glucógeno en el hígado y evita la producción de glucosa. Alternativamente, el glucagón induce la producción de glucosa y previene la síntesis de glucógeno. En estados de resistencia a la insulina no se puede suprimir la liberación de ácidos grasos, lo que da como resultado una lipólisis incrementada y un mayor flujo de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma, lo cual conduce a un aumento de la gluconeogénesis hepática (Goldberg, 2006; Kim *et al.*, 2004) y la acumulación de grasa dentro del hepatocito lo que puede desencadenar la enfermedad del hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (El-Serag, 2004). No obstante, hasta la fecha, no existe un tratamiento estandarizado para el hígado graso no alcohólico y no hay consenso sobre cuál es el más apropiado para cada paciente (Mendoza-Jiménez, 2013). Es por ello que las personas recurren comúnmente a la medicina tradicional para el tratamiento empírico de enfermedades relacionadas con la diabetes (Argáez-López *et.al.*, 2003). Se han utilizado combinaciones de polifenoles debido a sus posibles efectos sinérgicos (Hajimehdipoor *et al.*, 2014). Además, los efectos sinérgicos entre algunos flavonoides (eriodictina y eriodictiol) y vitamina C se han mencionado en una patente de un agente antioxidante utilizado en alimentos o bebidas (Fukumoto *et al.*, 2007). La interacción de los flavonoides con otros antioxidantes se describió por primera vez en 1936 (Rusznayak, 1936; Bentsath *et al.*, 1936), cuando se descubrió que los extractos de pimienta roja húngara contenían un factor protector de ascorbato, llamado vitamina P. Posteriormente, algunos estudios mostraron que las interacciones biológicas tuvieron lugar entre flavonoides y algunas vitaminas en modelos *in vitro* e *in vivo* (Lotito y Fraga, 1998; Kadom *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2006). Sin embargo, en algunos casos se ha postulado la posible existencia de efectos sinérgicos o antagonistas entre los diversos antioxidantes presentes en los alimentos vegetales y productos derivados (Vinson *et al.*, 2001; García-Alonso *et al.*, 2004).

En la medicina tradicional mexicana, las hojas de *Justicia spicigera* se usan ampliamente para el tratamiento empírico de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Johnson *et al.*, 2006). En estudios realizados por Ortiz-Andrade *et al.* (2012), se demostró que el extracto etanólico de *Justicia spicigera* (EJS) presenta efecto antioxidante en pruebas realizadas *in vitro* y un efecto hipoglucémico en ratas diabéticas inducidas con stz, administrado antes de

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

la prueba de tolerancia oral a la glucosa, atribuyendo este efecto al kaempferitrin, un compuesto fenólico abundante en el extracto etanólico de *J. spicigera* (Euler y Alam, 1982). Por otro lado, varios estudios han demostrado que las concentraciones farmacológicas de biotina tienen efectos hipoglucemiantes (Koutsikos, 1996; Hemmati *et al.*, 2009; Albarracin *et al.*, 2007; Sahin *et al.*, 2013; Aldahmash *et al.*, 2016) al mejorar la acción y la secreción de insulina (Reddi *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 2012; De La Vega-Monroy *et al.*, 2013; Sahin *et al.*, 2013) así como la tolerancia a la glucosa (Reddi *et al.*, 1988; Zhang, 1996), hipotrigliceridémicos (Revilla-Monsalve *et al.*, 2006; Albarracin *et al.*, 2007; Aguilera-Méndez y Fernandez-Mejia, 2012; Larrieta *et al.*, 2010) y efectos antihipertensivos (Watanabe *et al.*, 2008; Aguilera *et al.*, 2018, 2019). Además en un estudio realizado por Aguilera-Mendez *et al.*, (2018) se demostró que en un modelo de síndrome metabólico desarrollado por la ingestión crónica de fructosa, la biotina tenía un efecto protector sobre varias de sus manifestaciones, reduciendo la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la esteatosis hepática, la lipoperoxidación hepática y la alta presión sanguínea, Por lo que en el presente estudio se busca obtener un efecto sinérgico protector en hígado de ratas diabéticas administradas con extracto de *J. Spicigera* y biotina.

Materiales y métodos

Identificación y recolección de la planta *Justicia spicigera*

Las muestras de *Justicia spicigera* fueron colectadas en Morelia Michoacán, México (19°41'56"Norte y 101°13'43"Oeste) durante los periodos de abril – agosto de 2018 y noviembre de 2018 – febrero de 2019.

Preparación del extracto de acetato de etilo de las hojas de *Justicia spicigera*

El extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* fue obtenido mediante la maceración en frío (4°C) de la hoja con el solvente en relación 1:10 (p/v) durante 10 días en la oscuridad; posteriormente fue filtrado y concentrado en un rotavapor a 55°C para conseguir el extracto en crudo que, finalmente se preparó a una concentración de 80mg / mL disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%.

Preparación de la solución de biotina

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

La biotina fue disuelta en buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.4 a una concentración de 2 mg/mL. Se almaceno en frío a 4°C y se preparó una vez cada 5 días para su administración vía orofaríngea.

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (450-500 g) con 5 meses de edad, mantenidas en condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, alimentadas con una dieta estándar para roedores con presentación comercial de croquetas marca Nutricubos Purina® y agua purificada de acceso libre. La administración del extracto se realizó mediante el uso de una sonda orofaríngea durante 60 días, ajustando la dosis de acuerdo al peso corporal cada 6 días. Se siguieron los protocolos de cuidado y manejo de animales de experimentación expedido por la Secretaria de Agricultura (**NOM-062-ZOO-1999**) y la aprobación de este protocolo por el Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Inducción a diabetes

La inducción a diabetes se realizó con previo ayuno de 16 horas, mediante una inyección de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (40 mg/kg) disuelto en buffer de citrato (pH 4.5). Los grupos control fueron administrados únicamente con buffer de citrato (vehículo). A los 10 días después de la inyección de la STZ se les midió la glucemia para confirmar la diabetes. Las ratas diabéticas que presentaron los niveles de glucemia >200 mg/dL se seleccionaron para el análisis.

Diseño experimental

Se dividieron al azar 80 ratas en 8 grupos que recibieron tratamiento durante un periodo de 60 días, de la siguiente manera: un grupo normoglucémico control (NC) y un grupo diabético control (DC) tratados con DMSO 1%, un grupo normoglucémico (NB) y un grupo diabético tratados durante 30 días con biotina (DB), un grupo normoglucémico (NEPVB) y un grupo diabético (DEPVB) tratados durante 60 días con el extracto de acetato de etilo de *Justicia*

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

spicigera correspondiente al periodo de primavera – verano y por 30 días con biotina, un grupo normoglucémico (NEOIB) y un grupo diabético (DEOIB) tratados durante 60 días con el extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* correspondiente al periodo de otoño – invierno y por 30 días con biotina.

Grupo	Tratamiento	
	30 días	30 días
NC	DMSO 1%	
DC		
NB	DMSO 1%	Biotina
DB		
NEPVB	Extracto	Extracto con Biotina
DEPVB		
NEOIB		
DEOIB		

Determinación de los niveles de peso, glucosa y triacilglicéridos durante el tratamiento

El peso corporal de las ratas de cada grupo se registró en gramos (g) al inicio y al final del tratamiento de 60 días. El porcentaje de ganancia de peso se determinó por la diferencia del peso final y el peso inicial en función del peso inicial multiplicado por 100.

$$\left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

La determinación de los niveles de glucemia y triacilglicéridos se realizaron de manera individual en cada uno de los animales después de un ayuno de 12 horas, posteriormente se hizo una punción en la vena caudal de la cola del animal con la ayuda de una lanceta metálica estéril para tomar una gota de sangre sobre una tirilla reactiva especial para cada determinación.

Los niveles de glucosa en sangre se determinaron cada 6 días después de iniciar con el tratamiento, utilizando el método de glucosa-oxidasa. Para esto se empleó un glucómetro (Accucheck Performa). Mientras que la cuantificación de triacilglicéridos se llevó a cabo a los 12 y 36 días después de iniciar el tratamiento mediante el empleo de un equipo Accutrend

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Plus (Roche). El principio de medición se basa en la reflexión de la luz sobre la tira portarreactiva que contiene un sustrato cromógeno.

Determinación del porcentaje de peso del hígado al final del tratamiento

Al finalizar el tratamiento de 60 días con extracto de acetato de etilo de *J. spicigera*, las ratas fueron sacrificadas y el hígado fue diseccionado. El porcentaje de peso húmedo del hígado fue determinado en función del peso corporal de la siguiente manera:

$$\left(\frac{\text{Peso del hígado}}{\text{Peso corporal}} \right) \times 100$$

Obtención del suero sanguíneo

Concluidos los 60 días de tratamiento, las ratas fueron sometidas a eutanasia, previo ayuno de 12 horas. Las muestras sanguíneas obtenidas fueron colocadas en tubos secos BD Vacutainer® para Suero con activador de coagulación, posteriormente se centrifugaron a 7,500 rpm durante 10 minutos para obtener el suero y realizar las pruebas de perfil de lípidos y de función hepática.

Determinación de los parámetros de perfil de lípidos

El perfil lipídico (colesterol total, colesterol unido a HDL, colesterol unido a LDL, colesterol unido a VLDL, triacilglicéridos, lípidos totales e índice aterogénico) fue determinado en suero usando el equipo de química seca DRI-CHEM NX500i que utiliza placas de múltiples capas que cuantifican enzimas y productos químicos generales, utilizando un método colorimétrico.

Determinación de los parámetros de función hepática

Las pruebas de funcionamiento hepático o perfil hepático (proteínas totales, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transferasa, aspartato amino transferasa y alanino amino transferasa), se determinaron utilizando el

“Efecto del extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera* y la biotina en hígado de ratas diabéticas”

equipo de química seca DRI-CHEM NX500i con el mismo fundamento que en las pruebas del perfil lipídico.

Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de hígado fueron aisladas empleando la técnica descrita por Saavedra-Molina y Devlin (1997). El hígado fue obtenido mediante una incisión en el abdomen y fue colocado en 25 mL de medio 1 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) a 4°C y fueron homogeneizados empleando un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón. El homogenado fue centrifugado a 2,000 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue centrifugado a 7,500 rpm por 10 min. El precipitado (fracción mitocondrial) fue resuspendido en 2 mL de medio 2 (Sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, KH₂PO₄ 40 mM y EDTA 30 mM; pH 7.2) y centrifugado a 9,000 rpm por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 1 mL de medio 2.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949). Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen empleado en la determinación de la actividad de catalasa (CAT) en homogenado de hígado, así como la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), los niveles de TBARS, glutatión total (GLUT), glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH) en mitocondrias de hígado.

Cuantificación de triacilglicéridos en hígado

La concentración de triacilglicéridos hepáticos se determinó en homogenado de hígado siguiendo el protocolo reportado por Aguilera-Méndez y Fernández-Mejía (2012) con algunas modificaciones. Se tomó el equivalente a 20 µg de proteína por µL de la muestra. Posteriormente, a cada muestra se le añadió cbp 1 mL de solución PBS con tritón-X100 al 5%. Las muestras fueron sometidas en baño ultrasónico a 60° C durante 5 min y se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 13 300 rpm durante 15

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

min y se tomó el sobrenadante para determinar la concentración de triacilglicéridos de acuerdo al kit de ensayo comercial Spinreact (Sant Esteve de Bas, Spain).

Determinación de la actividad de la enzima catalasa en homogenado de hígado de rata

La actividad de CAT fue determinada por la cantidad del oxígeno disuelto usando un oxímetro. El método se basa en el principio de Clark. Se usan generalmente membranas de polietileno y fluorocarbono al ser permeables al oxígeno molecular y relativamente robustas. Cuando el voltaje es aplicado el gas de oxígeno, presente en la electrólisis es reducido a un ion OH^- , en el cátodo de platino. La corriente resultante es proporcional a la concentración de oxígeno molecular, esta puede transformarse fácilmente en unidades de concentración por medios de varios procedimientos de calibración en mg de O_2 /L (Mayari *et al.*, 2005). La determinación de catalasa se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante un periodo de tiempo, por lo que para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo (3 min) o la formación de burbujas debido a la liberación de oxígeno, es necesario usar una concentración de H_2O_2 (6mM) relativamente baja. La temperatura de descomposición del H_2O_2 es pequeña, de manera que las mediciones se realizaron a una temperatura de 20 °C, en buffer de fosfatos a pH de 7.4.

Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa

La actividad de la SOD fue determinada empleando un kit de análisis comercial (Sigma-Aldrich, USA), el cual permite analizar la actividad de la enzima mediante un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio Dojindo altamente soluble en agua, WST-1 (Sal monosódica (2(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que produce un tinte formando cuando es reducida por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. Las lecturas fueron tomadas a 450 nm empleando un lector de micro placa Multiskan Go (Thermo Scientific).

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Determinación de los niveles de glutatión total, reducido y oxidado en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas

La medición de niveles de glutatión total se realizó utilizando el método espectrofotométrico de Griffith (1980) modificado, basado en un ensayo cinético en que las cantidades catalíticas (nmoles) de glutatión reducido (GSH) provocan una reducción de 5,5'-Ditio-bis [ácido 2-nitrobenzoico (DTNB)] a ácido 5-tio-nitrobenzoico (TNB) que es detectado a 412 nm, después el glutatión oxidado (GSSG) formado se recicla en presencia de Glutatión Reductasa y NADPH. Los niveles de GSSG se determinaron por derivatización de GSH con vinilpiridina y por diferencia fueron calculados los niveles de GSH.

Resultados

Efecto sinérgico de la biotina con el extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre el peso corporal, la glucosa y triacilglicéridos en ratas diabéticas.

La ganancia de peso corporal es representada como porcentaje en la figura 14. Los resultados exhibieron un aumento del peso corporal en los grupos normoglucémicos mientras que los grupos diabéticos presentaron una disminución de su peso corporal. Sin embargo, los grupos diabéticos administrados con biotina y extracto con biotina presentaron a tendencia a evitar la pérdida de peso corporal en contraste con el grupo diabético control.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

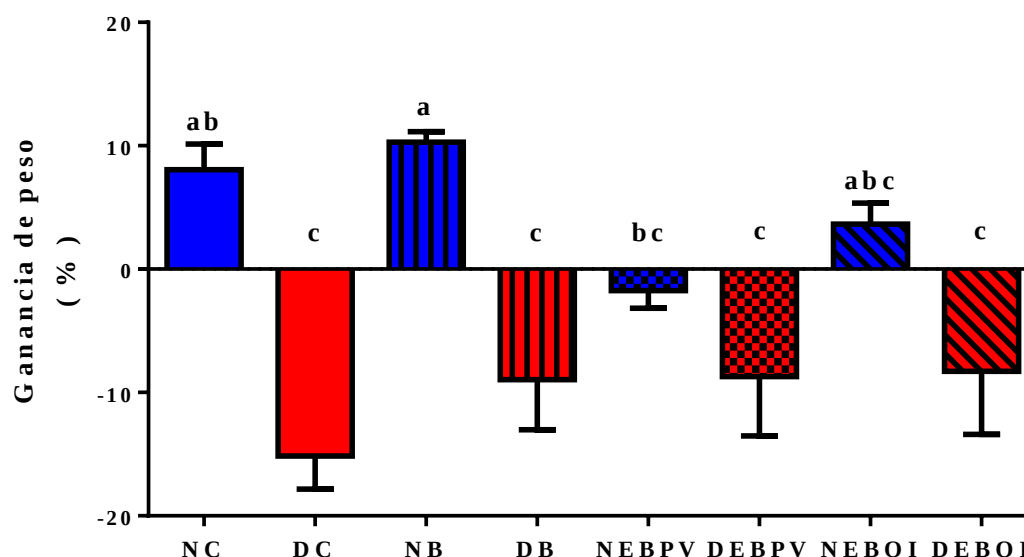


Figura 14. Porcentaje de ganancia de peso al final del tratamiento con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera-verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Los niveles de glucemia obtenidos durante el tratamiento fueron representados en mg/dL (figura 15). Los resultados obtenidos los primeros 30 días corresponden a los grupos control y administrados con extracto recolectado durante los periodos de primavera – verano y otoño – invierno. La biotina fue administrada de manera individual y como tratamiento combinado con el extracto desde el día 30 hasta el día 60. Como se observó en la gráfica 12, ninguno de los grupos diabéticos presento diferencias significativas en los valores de glucemia desde el inicio hasta los 30 días de tratamiento con extracto al ser confrontado con el grupo diabético control. Sin embargo, el grupo diabético que recibió el tratamiento combinado con biotina y extracto obtenido en primavera - verano a los 36 y 60 días presentó una disminución significativa en los valores de glucemia al ser comparado con el grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos que recibieron tratamientos no presentaron diferencias significativas con el grupo normoglucémico control.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

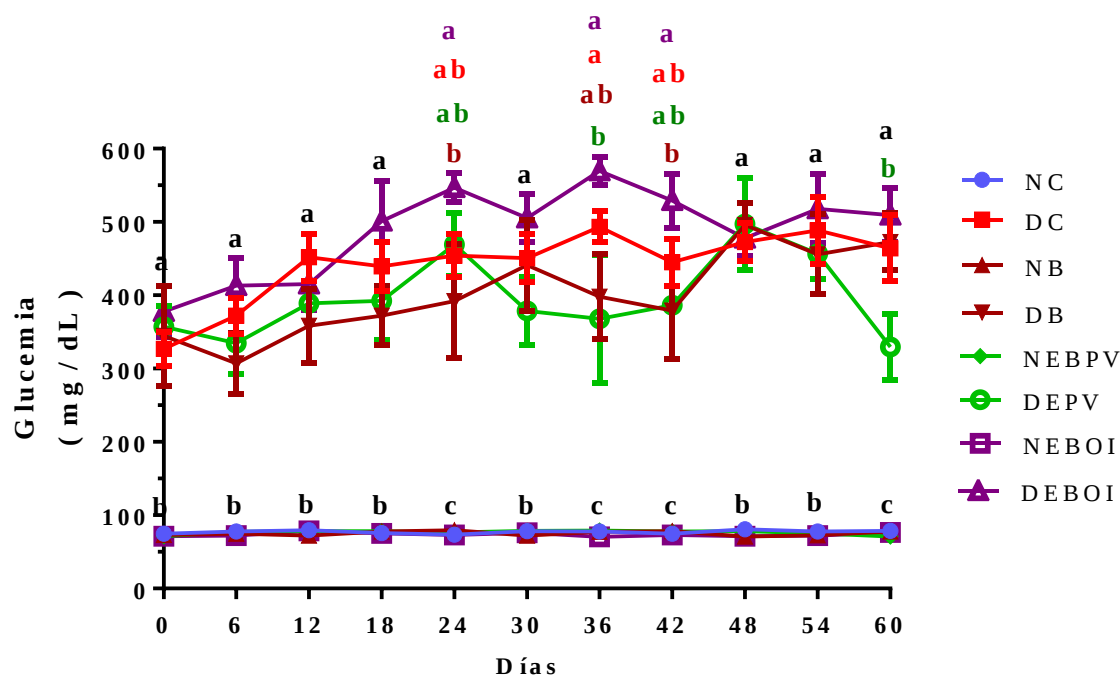


Figura 15. Niveles de glucemia obtenidos durante el tratamiento con biotina (2 mg/kg) y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* (80 mg/kg) recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. Extracto: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Los niveles de triacilglicéridos fueron representados en la figura 16 a los 12, 36 y 60 días de tratamiento, donde los valores presentados en los grupos que recibieron la biotina de manera individual y el tratamiento combinado con biotina mostraron una disminución significativa desde los 36 días de tratamiento al ser comparados con el grupo diabético control y no exhibieron diferencias significativas al ser confrontados con el grupo normoglucémico control y los grupos normoglucémicos que recibieron el mismo tratamiento.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

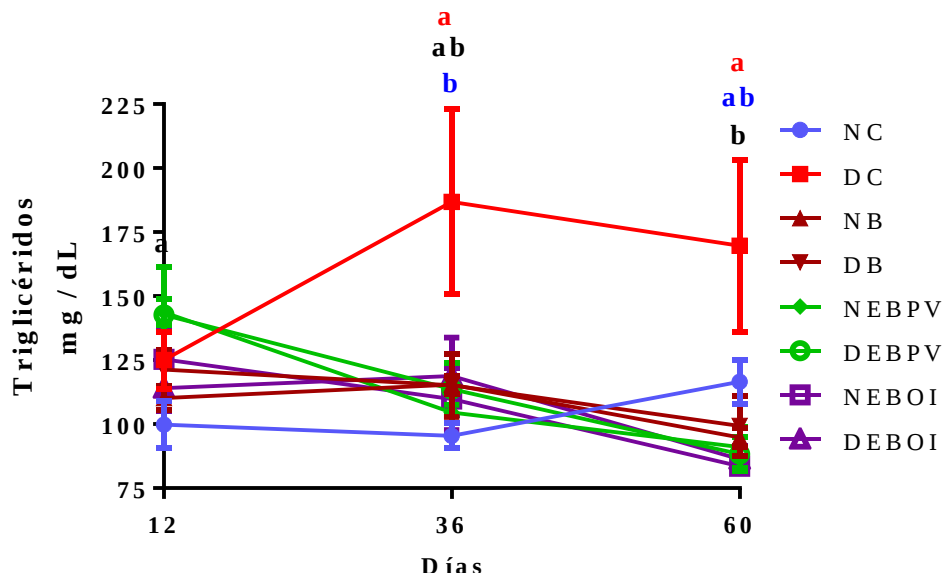


Figura 16. Niveles de triacilglicéridos obtenidos durante el tratamiento con biotina (2 mg/kg) y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* (80 mg/kg) recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Efecto sinérgico de la biotina con el extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre el peso del hígado y los niveles de triacilglicéridos hepáticos

El porcentaje de peso del hígado fue obtenido al final del tratamiento y representado en gramos como se muestra en la figura 17, donde se pudo observar que el grupo diabético control presentó un aumento significativo al ser confrontado con el grupo normoglucémico control; Sin embargo, el grupo diabético que recibió el tratamiento combinado de biotina con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano manifestó una disminución significativa del porcentaje de peso del hígado al ser comparado con el grupo diabético control, mientras que los grupos diabético administrado con biotina y diabético administrado con el tratamiento combinado de biotina con extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno, presentaron una tendencia a disminuir el porcentaje de peso del hígado. Los grupos normoglucémicos tratados no presentaron diferencias significativas con el grupo normoglucémico control.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

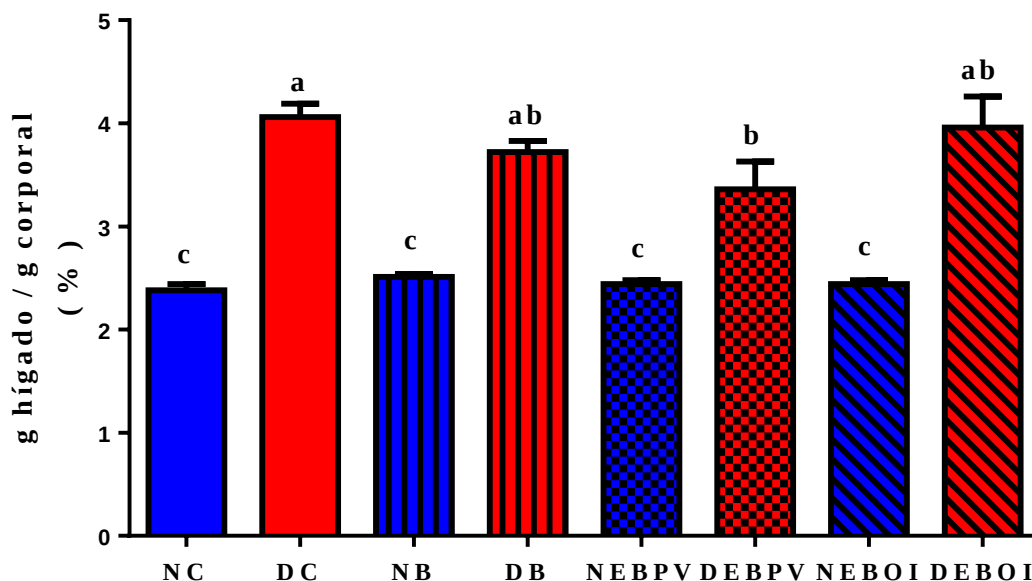


Figura 17. Porcentaje de peso del hígado obtenido al final del tratamiento con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: la temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Los niveles de triacilglicéridos hepáticos obtenidos fueron representados en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Como se muestra en la figura 18, los grupos diabéticos administrados con biotina y tratados de manera combinada con biotina y extracto presentaron una disminución significativa en el contenido de triacilglicéridos al ser confrontado con el grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos que recibieron el tratamiento no presentaron diferencias significativas con los grupos normoglucémico control y diabéticos administrados con extracto.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

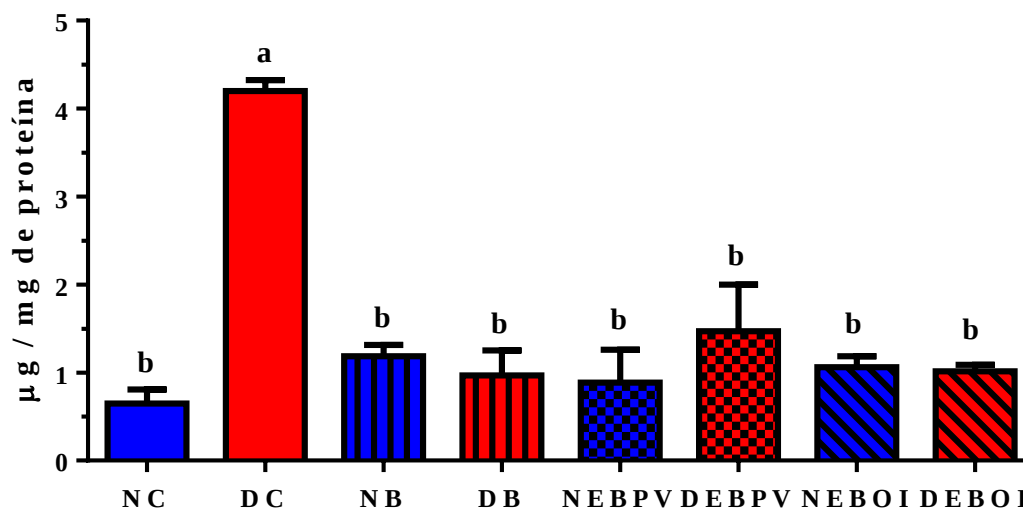


Figura 18. Niveles de triacilglicéridos hepáticos obtenido al final del tratamiento con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectada durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Efecto sinérgico de la biotina y el extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre el perfil de lípidos en ratas diabéticas

Los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros del perfil de lípidos se muestran en la tabla 5. Como se observa en la tabla los niveles exhibidos de colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y a lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentado en los grupos que recibieron tratamiento no muestran diferencias significativas al ser comparados con los grupos control. Sin embargo, los valores de colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de lípidos totales (LT) muestran un aumento significativo y una tendencia a aumentar el índice aterogénico plasmático (IAP) en el grupo diabético control al ser comparado con el grupo normoglucémico control. Mientras que los grupos diabéticos administrados con biotina y que recibieron tratamiento combinado de biotina con extracto presentaron una disminución significativa en los niveles de colesterol unido a VLDL y de LT, así como una tendencia a disminuir el IAP al ser comparados con el

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos tratados no presentaron diferencias significativas en el perfil de lípidos al

ser confrontados con los grupos diabéticos que recibieron el mismo tratamiento.

Tabla 5. Perfil de lípidos obtenido en suero al final del tratamiento con biotina y con extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera*.

	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol unido a lipoproteína de alta densidad (mg/dL)	Colesterol unido a lipoproteína de baja densidad (mg/dL)
NC	71.40 ± 4.06 ^a	37.40 ± 1.81 ^{ab}	34.00 ± 3.02 ^a
DC	62.60 ± 1.86 ^a	31.80 ± 0.86 ^{ab}	30.80 ± 2.48 ^a
NB	71.00 ± 6.85 ^a	38.20 ± 3.84 ^a	32.80 ± 3.02 ^a
DB	61.20 ± 3.77 ^a	34.60 ± 3.04 ^{ab}	26.60 ± 1.08 ^a
NEBPV	70.33 ± 3.18 ^a	30.33 ± 0.67 ^{ab}	40.00 ± 2.65 ^a
DEBPV	57.00 ± 6.66 ^a	24.67 ± 1.76 ^b	32.33 ± 5.24 ^a
NEBOI	63.00 ± 5.58 ^a	31.75 ± 3.50 ^{ab}	31.25 ± 2.46 ^a
DEBOI	62.33 ± 6.84 ^a	35.67 ± 2.73 ^{ab}	26.67 ± 4.18 ^a
	Colesterol unido a lipoproteína de muy baja densidad (mg/dL)	Lípidos totales (mg/dL)	Índice aterogénico plasmático
NC	23.32 ± 0.00 ^{ab}	338.40 ± 22.27 ^{ab}	0.49 ± 0.03 ^{ab}
DC	33.93 ± 0.00 ^a	415.80 ± 63.80 ^a	0.71 ± 0.11 ^a
NB	18.95 ± 0.00 ^b	290.25 ± 10.09 ^b	0.43 ± 0.05 ^b
DB	19.85 ± 0.00 ^b	287.10 ± 26.95 ^b	0.47 ± 0.05 ^{ab}
NEBPV	18.20 ± 0.00 ^b	283.95 ± 20.65 ^b	0.50 ± 0.04 ^{ab}
DEBPV	17.65 ± 0.00 ^b	259.65 ± 18.17 ^b	0.60 ± 0.03 ^{ab}
NEBOI	16.70 ± 0.00 ^b	253.35 ± 8.95 ^b	0.49 ± 0.04 ^{ab}

N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Efecto sinérgico de la biotina y el extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre los parámetros de función hepática en ratas diabéticas

Los valores obtenidos en las pruebas de función hepática se representaron en la tabla 6. Los resultados exhibidos en los parámetros de proteínas totales (PT) y bilirrubina no muestran diferencias significativas entre los grupos control y tratados. Sin embargo, los niveles de fosfatasa alcalina (FA), gamma glutamil transferasa (GGT), aspartato amino transferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) fueron significativamente mayores en el grupo diabético control al ser comparado con el grupo normoglucémico control. Por otro lado, el grupo diabético que recibió el tratamiento de biotina combinado con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano, presentó una disminución significativa de los valores obtenidos en la determinación de FA y GGT, así como una tendencia a disminuir los valores de AST y ALT al ser confrontado con el grupo diabético control mientras que los grupos diabético tratado con biotina y diabético que recibió el tratamiento de biotina combinado con extracto obtenido durante la temporada de otoño – invierno no presentaron diferencias significativas al ser comparados con el grupo diabético control en los niveles de FA y GGT. Sin embargo, mostraron una tendencia a disminuir los niveles de AST y ALT. Los grupos normoglucémicos tratados no presentaron diferencias significativas en los parámetros de función hepática obtenidos al ser comparados con el grupo normoglucémico control.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Tabla 6. Pruebas de función hepática obtenido en suero al final del tratamiento con biotina y con extracto de acetato de etilo de *Justicia spicigera*.

	Proteínas totales (g/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	Bilirrubina directa (mg/dL)	Bilirrubina indirecta (mg/dL)
NC	6.62 ± 0.19 ^a	0.28 ± 0.06 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.06 ^a
DC	6.08 ± 0.33 ^a	0.36 ± 0.05 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.05 ^a
NB	6.68 ± 0.20 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
DB	6.20 ± 0.14 ^a	0.34 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.04 ^a
NEBPV	7.08 ± 0.14 ^a	0.20 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.13 ± 0.03 ^a
DEBPV	6.70 ± 0.23 ^a	0.15 ± 0.05 ^a	0.12 ± 0.20 ^a	0.16 ± 0.12 ^a
NEBOI	6.74 ± 0.42 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.03 ^a
DEBOI	6.23 ± 0.27 ^a	0.35 ± 0.06 ^a	0.10 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.06 ^a
	Fosfatasa alcalina (U/L)	Gamma Glutamil transferasa (U/L)	Aspartato aminotransferasa (U/L)	Alanino aminotransferasa (U/L)
NC	160 ± 18.30 ^{bc}	2.00 ± 0.45 ^b	260.40 ± 24.15 ^b	79.00 ± 05.66 ^b
DC	1182.40 ± 0.60 ^a	15.40 ± 2.40 ^a	789.20 ± 106.93 ^a	504.80 ± 84.87 ^a
NB	179.60 ± 16.08 ^{bc}	1.40 ± 0.24 ^b	291.40 ± 10.45 ^b	87.00 ± 10.07 ^b
DB	1126.00 ± 46.57 ^a	3.00 ± 3.36 ^a	594.60 ± 170.48 ^{ab}	395.25 ± 179.61 ^{ab}
NEBPV	196.60 ± 19.10 ^{bc}	1.00 ± 0.00 ^b	261.80 ± 38.17 ^b	77.40 ± 04.30 ^b
DEBPV	454.25 ± 202.65 ^b	3.00 ± 0.63 ^b	486.20 ± 144.29 ^{ab}	197.00 ± 74.98 ^{ab}
NEBOI	133.80 ± 11.85 ^c	2.00 ± 0.45 ^b	308.20 ± 33.10 ^b	82.00 ± 06.27 ^b
DEBOI	1182.25 ± 0.75 ^a	14.33 ± 3.28 ^a	441.50 ± 146.89 ^{ab}	214.25 ± 61.09 ^{ab}

N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en hígado de ratas diabéticas

La actividad de la enzima SOD2 obtenida fue representada en U*mg de proteína. Los resultados presentados en cada uno de los grupos fueron presentados en la figura 19, donde podemos observar un aumento significativo de la actividad de SOD en los grupos que recibieron el tratamiento combinado, especialmente los grupos administrados con biotina de

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

manera conjunta con el extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano, al ser comparados con el grupo diabético control. Los grupos normoglucémicos y diabéticos que recibieron el mismo tratamiento no presentaron diferencias significativas al ser comparados entre ellos. Por otro lado, se mostró una disminución de la actividad de la enzima en los grupos normoglucémico y diabético al ser administrado el tratamiento con biotina cuando fueron comparados con los grupos normoglucémico control y diabético control.

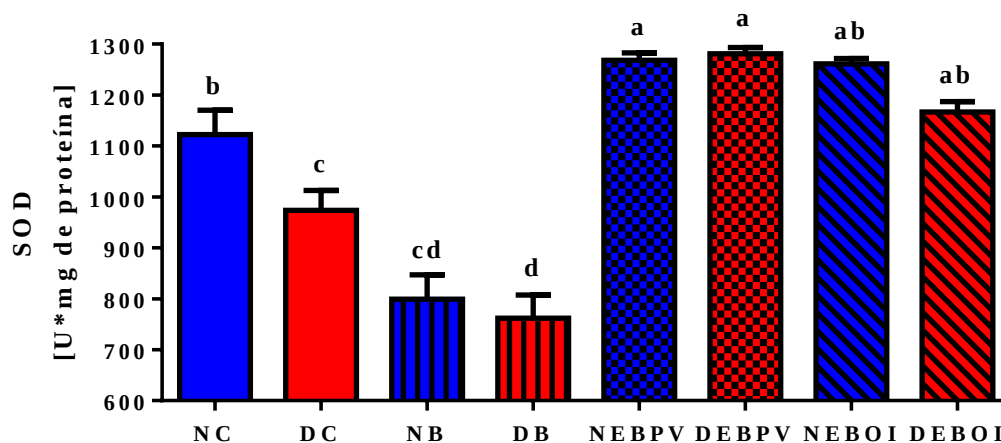


Figura 19. Actividad de la enzima SOD en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

La actividad de la enzima catalasa obtenida en cada uno de los grupos es representada en la figura 20 donde, el grupo diabético control presento una disminución significativa en la actividad de catalasa mientras que los grupos normoglucémico y diabético que recibieron el tratamiento combinado de biotina con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano presentaron un aumento significativo en la actividad de la enzima al ser comparados con los grupos normoglucémico control y diabético control. Por otro lado, los grupos diabético administrado con biotina y diabético administrado con biotina de manera conjunta

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

con el extracto obtenido durante la temporada de otoño - invierno presentaron una tendencia a aumentar la actividad de catalasa al ser comparados con el grupo diabético control.

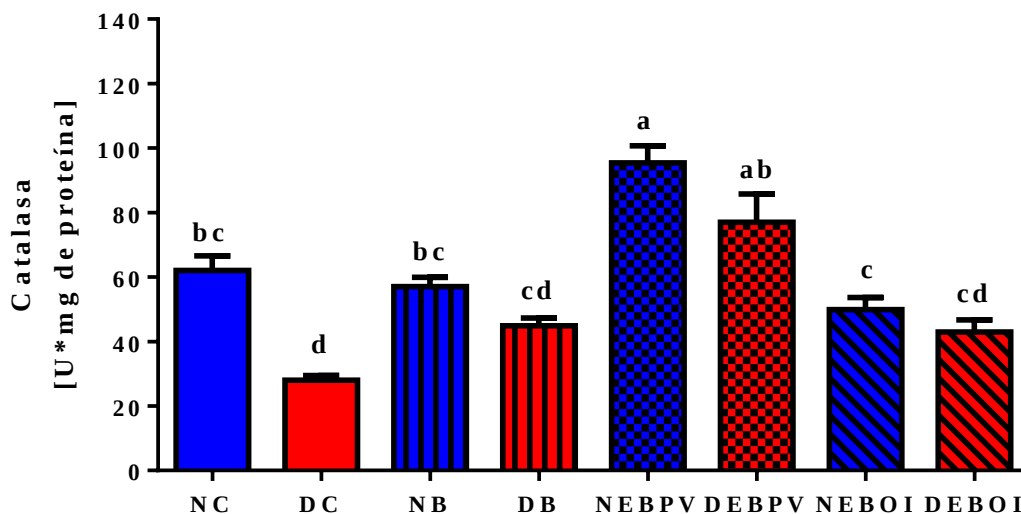


Figura 20. Actividad de la enzima CAT en homogenado de hígado de ratas tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

Efecto sinérgico de la biotina y el extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera - verano y otoño - invierno sobre los niveles de glutatión en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas

Los niveles de glutatión total fueron representados en $\mu\text{moles/mg}$ de proteína. Como podemos observar en la figura 21, sólo el grupo normoglucémico administrado con biotina no presentó diferencias significativas al ser comparado con el grupo normoglucémico control. Mientras que los grupos normoglucémicos y diabéticos administrados con el tratamiento combinado no presentaron diferencias significativas al ser confrontados con el grupo diabético control. Sin embargo, los grupos administrados con biotina y el tratamiento combinado de biotina con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano, mostraron una tendencia a aumentar el porcentaje de glutatión reducido (GSH) y una tendencia a disminuir el porcentaje de glutatión oxidado (GSSG) al ser comparado con el

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

grupo diabético control. Además, no se presentaron diferencias significativas al ser confrontados con los grupos normoglucémicos que recibieron el mismo tratamiento (figuras 22 y 23). Como se puede apreciar en la figura 24, estos resultados reflejan una relación mayor de glutatión reducido sobre el glutatión oxidado.

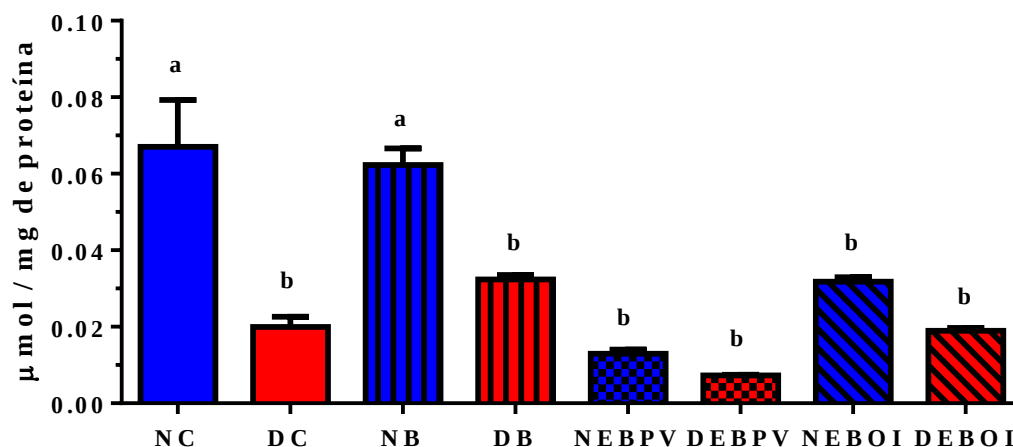


Figura 21. Niveles de glutatión en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera-verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

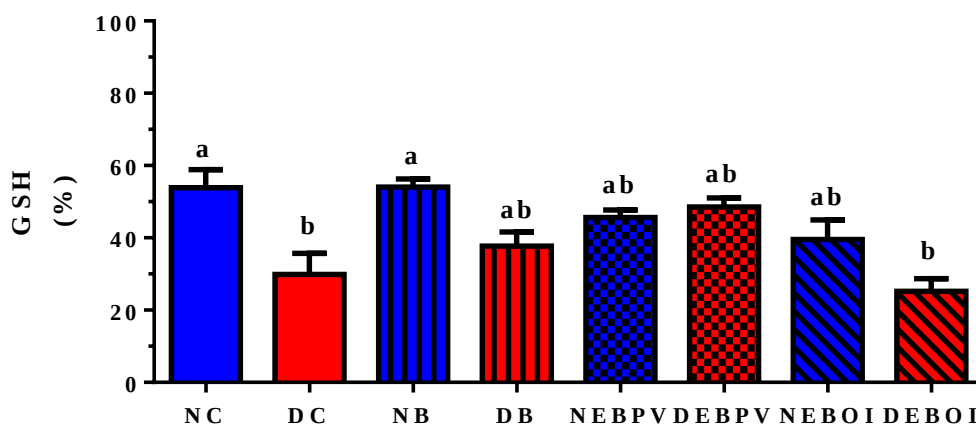


Figura 22. Porcentaje de GSH en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera-verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

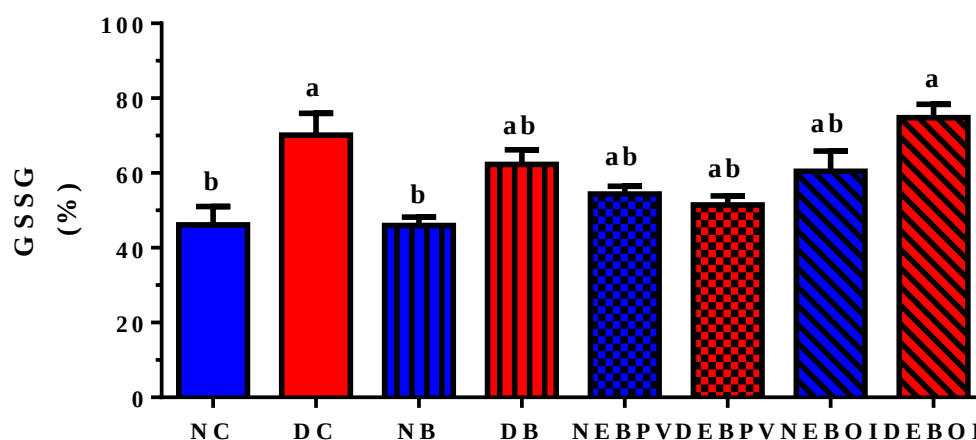


Figura 23. Porcentaje de GSH en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera-verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

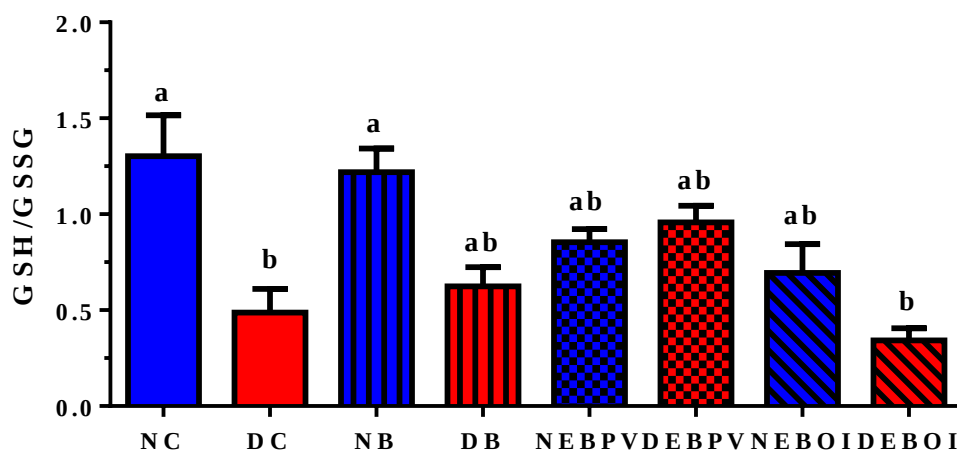


Figura 24. Relación de GSH/ GSSG en mitocondrias de hígado tratadas con biotina y extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* recolectado durante las temporadas de primavera- verano y otoño – invierno. N: normoglucémico. D: diabético. C: control. B: biotina. E: extracto. PV: temporada de primavera - verano. OI: temporada de otoño - invierno. Los valores presentados fueron analizados mediante la prueba *Anova* y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0.05$

VII.2.1. Discusión

Muchos estudios sobre el potencial antioxidante de los flavonoides en frutas, verduras, vino o té han concluido que es imposible predecir el poder antioxidante de un producto dado al estudiar solo un tipo de flavonoide u otro tipo de antioxidantes contenidos en el producto, como vitamina C o E debido a que, en algunos casos se ha postulado la posible existencia de efectos sinérgicos o antagonistas entre los diversos antioxidantes presentes en los alimentos vegetales y productos derivados (Vinson *et al.*, 2001; García-Alonso *et al.*, 2004). La actividad antioxidante de los fenólicos los ha introducido como formas de dosificación en la prevención y el tratamiento de muchos trastornos (Frericks *et al.*, 1950), por lo que, en nuestro estudio, fue administrado el extracto de *J. spicigera* de manera conjunta con la biotina.

J. spicigera produce metabolitos secundarios del tipo fenólico (Martínez, 1996) como el kaempferitrin el cual, presentó efecto hipoglucémico en ratas diabéticas (Ortiz-Andrade *et al.*, 2012). Tzeng *et al.* (2009) demostraron que el kaempferitrin estimula las vías de transducción de señalización de insulina clásicas en las células 3T3-L1: fosforilación del receptor de insulina, sustrato receptor de insulina 1 y otras proteínas reguladoras intracelulares, lo que aumenta la translocación de GLUT-4, responsable de la absorción de glucosa en casos sensibles a la insulina (Huang, 2007).

En la diabetes tipo 1, la exposición hepática a la insulina es crónicamente subnormal, incluso en el contexto de la terapia con insulina (Aoki *et al.*, 1993). Esta exposición subnormal a la insulina hepática conduce a una perturbación de la expresión de las enzimas hepáticas, de modo que las enzimas limitantes de la velocidad que catalizan la glucólisis (glucocinasa y piruvato quinasa) están subexpresadas, mientras que las enzimas requeridas para la gluconeogénesis, como la piruvato carboxicina, la fosfoenolpiruvato carboxicina hepática y la glucosa-6-fosfatasa están sobreexpresadas, como resultado la gluconeogénesis y la producción de glucosa hepática tienden a ser inadecuadamente altas en relación con la necesidad fisiológica. Sin embargo, existen tratamientos alternativos para aumentar la expresión hepática de la enzima glucocinasa en diabetes tipo 1 (McCarty, 2016). Varios estudios han demostrado que se requiere una ingesta adecuada de biotina para mantener el metabolismo normal de la glucosa (Dakshinamurti, 1968; Chauhan, 1991; Romero, 1999;

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Matschinsky, 1999; Sone, 1999). Además, existen varios estudios que indican que la biotina presenta efecto hipoglucémico, hipotriglicéridémico y antihipertensivo (**Reddi et al., 1988; Koutsikos, 1996; Zhang, 1996; Revilla-Monsalve et al., 2006; Albarracin et al., 2007; Watanabe et al., 2008; Hemmati et al., 2009; Larrieta et al., 2010; Sahin et al., 2013; Sasaki et al., 2012; De La Vega-Monroy et al., 2013; Sahin et al., 2013; Aldahmash et al., 2016; Aguilera-Méndez y Fernandez-Mejia, 2012; Aguilera et al., 2018, 2019**). La biotina afecta el gen del receptor de asialoglicoproteína hepática (**Collins et al., 1988**) y dos enzimas críticas del metabolismo de la glucosa: glucocinasa hepática (**Chauhan, 1991**) y fosfoenolpiruvato carboxicinas hepática (**Dakshinamurti, 1994**). La glucocinasa funciona como el sensor de glucosa, al regular la tasa de glucólisis y la producción de moléculas de señalización necesarias para la secreción de insulina (**Romero, 1999**). Nuestros resultados no muestran disminución de los niveles de glucemia en el grupo diabético tratado con biotina (figura 15), esto podría deberse a los mecanismos de captación de biotina intestinal cuando se administra a grandes dosis por vía oral, los cuales incluyen la difusión pasiva lenta y el proceso mediado por el transportador que se producen en el intestino delgado y el colon. Como resultado, puede esperarse la saturación del transportador con dosis altas y conducir a un aumento de las pérdidas renales de biotina (**Zempleni y Mock, 1999; Said, 2012**), evitando el efecto hipoglucémico dependiente de la dosis. Por otro lado, el extracto combinado con la biotina no generó efecto hipoglucémico (figura 15). Cuando la suma de los efectos es menor que la suma matemática que se predeciría a partir de los componentes individuales, se podría hablar de un efecto antagónico (**Wang et al., 2011**). Sin embargo, se requieren de más estudios para esclarecer estos resultados.

Por otro lado, la diabetes inducida por STZ se caracteriza por una pérdida severa en el peso corporal (**Symeonidis et al., 2009**). En el presente estudio el grupo diabético control, mostró una disminución significativa de su peso corporal, estos mismo resultados fueron reportados por Zafar y Naqvi en **2010**.

, los grupos diabéticos tratados con biotina y administrados con biotina de manera conjunta con el extracto, presentaron una tendencia a aumentar su peso corporal (figura 14). La disminución del peso corporal en las ratas diabéticas podría deberse a la deshidratación y al catabolismo de las grasas y las proteínas (**Hakim et al., 1997**). A pesar de que los mecanismos

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

de modulación del metabolismo de los lípidos por las concentraciones farmacológicas de biotina no se conocen por completo, se ha demostrado que la biotina como parte del grupo prostético de acetil CoA carboxilasa participa en el metabolismo de ácidos grasos (**Revilla et al., 2006; Albarracin et al., 2007; Aguilera y Fernandez, 2012; Larrieta et al., 2010; Aguilera, 2018**), nuestros resultados señalan que la biotina a dosis farmacológica podría estar implicado en la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, impidiendo la disminución de peso corporal y el aumento de peso del hígado (figura 17); asimismo demostró que es capaz de disminuir de manera significativa los niveles de TG desde los 6 días de tratamiento y de VLDLc, LT e IAP a los 60 días de tratamiento (tabla 5). Adicionalmente, se reportó la presencia de terpenoides como el β -Sitosterol en hojas de *J. spicigera* (**Domínguez et al., 1990**). Liang et al., en 2011 informaron que la actividad reductora del colesterol por el β -sitosterol se asoció con una baja regulación de la acil-CoA: colesterol aciltransferasa 2 (ACAT 2) y de la proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos (MTP). Además, otros estudios muestran que la supresión del diacilglicerol aciltransferasa-2 puede revertir la esteatosis hepática inducida por la dieta y la resistencia a la insulina (**Choi et al., 2007**). Por lo que en nuestro estudio, pudo contribuir a una disminución significativa del peso del hígado (figura 17) relacionado a la disminución de TG hepáticos (figura 18), al ser combinado con la biotina y administrado en ratas diabéticas mostrando un efecto sinérgico con el extracto obtenido durante la temporada de primavera - verano. Además, mostró una disminución significativa en los niveles de TG, VLDLc, LT e IAP en los grupos diabéticos que recibieron el tratamiento con biotina combinado con extracto.

El daño hepático es una complicación grave en la DM (**Mohamed et al., 2016**). La enfermedad hepática crónica más común observada en pacientes con DM es la EHGNA (**Amarapurkar, 2002**). Los pacientes con hígado graso no alcohólico se han caracterizado por ALT, AST y GGT elevados (**Mulhall et al., 2002**). En nuestro estudio, los grupos administrados con biotina y extracto con biotina presentaron una tendencia a disminuir los niveles de ALT y AST (tabla 6), mientras que los grupos que recibieron el tratamiento combinado de biotina con extracto obtenido durante la temporada de primavera – verano presentaron una disminución significativa en los niveles de FA y GGT, enzimas localizadas

en la membrana canalicular del hepatocito (Biel y gallegos., 2015), ejerciendo un efecto sinérgico protector del daño hepático.

La hiperglucemia en ratas diabéticas inducidas por STZ evoca el estrés oxidativo (Baskol *et al.*, 2007; Francés *et al.*, 2011). Los niveles elevados de estrés oxidativo en los animales diabéticos se deben a la autooxidación de la glucosa, la glucosilación de proteínas, la peroxidación de lípidos y las bajas actividades de las enzimas antioxidantes (Ceriello, 2000), SOD, CAT, GPx y GR, estas enzimas forman la primera línea del mecanismo de defensa antioxidante para proteger al organismo del daño oxidativo mediado por ERO (Nonaka *et al.*, 1991). Las disminuciones en la actividad hepática de GSH y CAT en ratas observadas en animales diabéticos no tratados, sugiere que CAT puede ser el principal determinante del estado antioxidante de este tejido (Wohaieb y Godin, 1987). Como podemos observar en la gráfica 17, los grupos tratados con biotina presentaron una disminución significativa de la actividad de SOD pero una tendencia a aumentar los niveles de CAT (gráfica 18) y GSH/GSSG (gráfica 22), demostrando efecto antioxidante al ser administrado vía oral. Por otro lado, el grupo que recibió tratamiento combinado con biotina y extracto recolectado durante la temporada de primavera verano presento un aumento significativo de la actividad de las enzimas SOD (figura 19) y CAT (figura 20), además mostro una tendencia a aumentar el porcentaje de GSH (figura 22) y disminuir el porcentaje de GSSG (figura 23), mostrando un efecto sinérgico antioxidante.

VII.2.2. Conclusiones

El tratamiento combinado de biotina con extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera – verano presenta un efecto hipolipemiente y antioxidante significativo en hígado de ratas diabéticas, lo cual podría estar relacionado a los efectos que biotina y los componentes del extracto presentan de manera individual, convirtiéndose en un potencial tratamiento para evitar la dislipidemia diabética y la aparición de hepatopatías de personas que padecen diabetes mellitus.

VII.2.3. Referencias

- Aguilera-Méndez, A., & Fernández-Mejía, C. (2012). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors*, 38(5), 387-394.
- Aguilera-Mendez, A., Hernandez-Equihua, M. G., Rueda-Rocha, A. C., Guajardo-Lopez, C., Nieto-Aguilar, R., Serrato-Ochoa, D., & Guzmán-Nateras, J. A. (2018). Protective effect of supplementation with biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition Research*, 57, 86-96.
- Albarracin, C., Fuqua, B., Geohas, J., Juturu, V., Finch, M. R., & Komorowski, J. R. (2007). Combination of chromium and biotin improves coronary risk factors in hypercholesterolemic type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blind randomized clinical trial. *Journal of the Cardiometabolic Syndrome*, 2(2), 91-97.
- Aldahmash, B. A., El-Nagar, D. M., & Ibrahim, K. E. (2016). Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 311-317.
- Amarapurkar, D., & Das, H. S. (2002). Chronic liver disease in diabetes mellitus. *Tropical Gastroenterology: Official Journal of the Digestive Diseases Foundation*, 23(1), 3-5.
- 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.
- Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., & Komai, M. (2008). Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 756-763.
- Aoki, T. T., Benbarka, M. M., Okimura, M. C., Arcangeli, M. A., Walter Jr, R. M., Wilson, L. D., ... & Kumagai, L. F. (1993). Long-term intermittent intravenous insulin therapy and type 1 diabetes mellitus. *The Lancet*, 342(8870), 515-518.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Argáez-López, N., Wacher, N. H., Kumate-Rodríguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera-Arce, E., & Lozoya, X. (2003). The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care*, 26(8), 2470-2471.

Argáez-López, N., Wacher, N. H., Kumate-Rodríguez, J., Cruz, M., Talavera, J., Rivera-Arce, E., & Lozoya, X. (2003). The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care*, 26(8), 2470-2471. Martín-Domínguez, V., González-Casas, R.,

Baig NA, Herrine SK, Rubin R. (2001). Liver disease and diabetes mellitus. *Clin Lab Med*, 21:193–207.

Bentsath, A., & Szent-Györgyi, A. (1936). Vitamin nature of flavones. *Nature*, 138(3497), 798-798.

Biel, F., BERNARDIN, D. M., & GALLEGOS, F. (2015). Interpretación de exámenes de laboratorio hepático y aproximación diagnóstica en pacientes con pruebas alteradas. *Recuperado Julio*, 19.

Ceriello, A. (2000). Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, 49(2), 27-29.

Chauhan, J., & Dakshinamurti, K. (1991). Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10035-10038.

Choi, C. S., Savage, D. B., Kulkarni, A., Yu, X. X., Liu, Z. X., Morino, K., ... & Zhang, D. (2007). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22678-22688.

Collins, J. C., Paietta, E., Green, R., Morell, A. G., & Stockert, R. J. (1988). Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11280-11283.

Dakshinamurti, K., & Cheah-Tan, C. (1968). Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46(1), 75-80.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Dakshinamurti, K., & Li, W. (1994). Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 132(2), 127-132.
- De La Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, A., & Fernandez-Mejia, C. (2013). Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 169-177.
- Domínguez X A, Achenbach H, González C, Ferré-D Amore A R. (1990). Estudio químico del “muitle” (*Justicia spicigera*). *Revista Química Latinoamericana*, 21: 142-143.
- El-serag, H. B., Tran, T., & Everhart, J. E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 126(2), 460-468.
- Euler, K. L., & Alam, M. (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45(2), 220-221.
- Federación Internacional de Diabetes. *Atlas de la Diabetes de la FID, 9ª edición*. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes, 2019.
- Ferrannini, E., Bjorkman, O., Reichard, G. A., Pilo, A., Olsson, M., Wahren, J., & DeFronzo, R. A. (1985). The disposal of an oral glucose load in healthy subjects: a quantitative study. *Diabetes*, 34(6), 580-588.
- Francés, D. E., Ronco, M. T., Ingaramo, P. I., Monti, J. A., Pisani, G. B., Parody, J. P., ... & Carnovale, C. E. (2011). Role of reactive oxygen species in the early stages of liver regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radical Research*, 45(10), 1143-1153.
- Frank, J., Budek, A., Lundh, T., Parker, R. S., Swanson, J. E., Lourenço, C. F., ... & Kamal-Eldin, A. (2006). Dietary flavonoids with a catechol structure increase α -tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. *Journal of Lipid Research*, 47(12), 2718-2725.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Frericks, C. T., Tillotson, I. G., & Hayman, J. M. (1950). The effect of rutin on capillary fragility and permeability. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 36, 933-939.
- Fukumoto, S. K., Tsuruhami, K., & Mori, S. (2007). Antioxidant material, anti-deterioration agent and food or beverage. *European Patent Application*. EP 1 783 193 A1.
- García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Pascual-Teresa, S. (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A – Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3378–3384.
- Goldberg, I. J., & Ginsberg, H. N. (2006). Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 130(4), 1343-1346.
- Gornall A G, Bardawill G J y David M M. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J Biol. Chem.* 177: 751-760.
- Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., & Shekarchi, M. (2014). Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3), 35-40.
- Hakim, Z. S., Patel, B. K., & Goyal, R. K. (1997). Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 41(4), 353-360.
- Harrison, S. A. (2006). Liver Disease in Patients With Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(1), 68–76.
- Hemmati M, Babaei H, Abdolsalehei M. (2013). Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in Kermanshah in Iran (200-2009). *Oman Med J*, 28:195– 8.
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237-252.
- Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., ... & Martinez, A. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

United States. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(4), 250-255.

Kim, J. K., Fillmore, J. J., Sunshine, M. J., Albrecht, B., Higashimori, T., Kim, D. W., ... & Littman, D. R. (2004). PKC- θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 823-827.

Koutsikos, D., Fourtounas, C., Kapetanaki, A., Agroyannis, B., Tzanatos, H., Rammos, G., & Sallum, G. (1996). Oral glucose tolerance test after high-dose iv biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Renal Failure*, 18(1), 131-137.

Larrieta E, Velasco F, Vital P, López-Aceves T, Lazo-De-La-Vega-Monrroy M, Rojas A, et al. (2010). Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *Eur J Pharmacol*. 644:263–8.

Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2011). Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219(1), 124-133.

Lotito, S. B., & Fraga, C. G. (1998). (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), 435-441.

Martínez, M., 1996. Las plantas medicinales de México, 7ª Reedición, Ediciones Botas. México. 656 pp.

Matschinsky, F. M. (1996). A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45(2), 223-241.

Navarro, R. M., Lloréns, M. D. C. E., & Ruiz, J. G. M. (2005). Validación de La Determinación de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas y Aguas Residuales. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 36.

McCarty, M. F. (2016). In type 1 diabetics, high-dose biotin may compensate for low hepatic insulin exposure, promoting a more normal expression of glycolytic and gluconeogenic enzymes and thereby Aiding glycemic control. *Medical Hypotheses*, 95, 45-48.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Bravo, J. J. M. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *SEMERGEN-Medicina de familia*, 27(3), 132-145.

Mendoza-Jiménez-Ridruejo, J., García-Buey, L., & 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.

Mohamed, J., Nafizah, A. N., Zariyantey, A. H., & 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.

Mulhall, B. P., Ong, J. P., & Younossi, Z. M. (2002). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(11), 1136-1143.

Nonaka, A., Manabe, T., & Tobe, T. (1991). Effect of a new synthetic ascorbic acid derivative as a free radical scavenger on the development of acute pancreatitis in mice. *Gut*, 32(5), 528-532.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario oficial de la federación, 22 de agosto de 2001. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., ... & García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 455-462.

Reddi, A., DeAngelis, B., Frank, O., Lasker, N., & Baker, H. (1988). Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sciences*, 42(13), 1323-1330.

Revilla-Monsalve, C., Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Báez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M. A., Hernández-Quiróz, P. M., & Fernandez-Mejia, C. (2006). Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(4), 182-185.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Romero-Navarro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M. S., Matschinsky, F. M., Velazquez, A., Wang, J., & Fernandez-Mejia, C. (1999). Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*, 140(10), 4595-4600.

Rusznayák, S., & Szent-Györgyi, A. (1936). Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*, 138, 27

Saavedra-Molina, A. y Devlin, T.M. (1997). Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis in rat liver. *Amino Acids*. 12: 293-298.

Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., Ozercan, I. H., ... & Komorowski, J. R. (2013). Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *British Journal of Nutrition*, 110(2), 197-205.

Said, H. M. (2012). Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. In *Water Soluble Vitamins* (pp. 1-19). Springer, Dordrecht.

Sasaki, Y., Sone, H., Kamiyama, S., Shimizu, M., Shirakawa, H., Kagawa, Y., ... & Furukawa, Y. (2012). Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food & Function*, 3(4), 414-419.

Schäuble, S., Stavrum, A. K., Puntervoll, P., Schuster, S., & Heiland, I. (2013). Effect of substrate competition in kinetic models of metabolic networks. *FEBS Letters*, 587(17), 2818-2824.

Sone, H., Ito, M., Sugiyama, K., Ohneda, M., Maebashi, M., & Furukawa, Y. (1999). Biotin enhances glucose-stimulated insulin secretion in the isolated perfused pancreas of the rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(4), 237-243.

Symeonidis, T., Chamilos, M., Hadjipavlou-Litina, D. J., Kallitsakis, M., & Litinas, K. E. (2009). Synthesis of hydroxycoumarins and hydroxybenzo [f]-or [h] coumarins as lipid peroxidation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(4), 1139-1142.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Tzeng, Y. M., Chen, K., Rao, Y. K., & Lee, M. J. (2009). Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*, 607(1-3), 27-34.

Vinson, J. A., & Jang, J. (2001). In vitro and in vivo lipoprotein antioxidant effect of a citrus extract and ascorbic acid on normal and hypercholesterolemic human subjects. *Journal of Medicinal Food*, 4(4), 187-192.

Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 960-968.

Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., & Komai, M. (2008). Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 756-763.

Wohaieb, S. A., & Godin, D. V. (1987). Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat: effects of insulin treatment. *Diabetes*, 36(9), 1014-1018.

Zafar, M., Naqvi, S. N. U. H., Ahmed, M., & Kaimkhani, Z. A. (2009). Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *International Journal of Morphology*, 27(3).

Zempleni, J., & Mock, D. M. (1999). Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 504-508.

Zhang, H., Osada, K., Maebashi, M., Ito, M., Komai, M., & Furukawa, Y. (1996). A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42(6), 517-526.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Las terapias convencionales para la diabetes tienen muchas deficiencias, como efectos adversos y una alta tasa de fracaso secundario y hasta la fecha, no existe un tratamiento

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

específico para el hígado graso no alcohólico y no hay consenso sobre cuál es el más apropiado para cada paciente (**Mendoza-Jiménez, 2013**). Por otro lado, se espera que los extractos de hierbas tengan una eficacia similar sin efectos secundarios como la de los medicamentos convencionales (**Sharma et al, 2008**). Muchos estudios sobre el potencial antioxidante de los flavonoides en frutas, verduras, vino o té han concluido que es imposible predecir el poder antioxidante de un producto dado al estudiar solo un tipo de flavonoide u otro tipo de antioxidantes contenidos en el producto, como vitamina C o E debido a que, en algunos casos se ha postulado la posible existencia de efectos sinérgicos o antagonistas entre los diversos antioxidantes presentes en los alimentos vegetales y productos derivados (**Vinson et al., 2001; García-Alonso et al., 2004**). Además, se ha demostrado un aumento en la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas como respuesta a altas y bajas temperaturas (**verma y shukla, 2015**) observadas de acuerdo a las estaciones de la año, de modo que la presente investigación se dirige a estudiar la administración del extracto de *J. spicigera* obtenido en diferente temporada estacional de manera conjunta con la biotina.

J. spicigera produce metabolitos secundarios del tipo fenólico (**Martínez, 1996**) como el kaempferitrin, que ha presentado efecto hipoglucémico en ratas diabéticas (**Ortiz-Andrade et al., 2012**). Tzeng et al. (2009) demostraron que el kaempferitrin estimula las vías de transducción de señalización de insulina clásicas en las células 3T3-L1: fosforilación del receptor de insulina, sustrato receptor de insulina 1 y otras proteínas reguladoras intracelulares, lo que aumenta la translocación de GLUT-4, responsable de la absorción de glucosa en casos sensibles a la insulina (**Huang, 2007**). Por otro lado, existen varios estudios que indican que la biotina presenta efecto hipoglucémico, hipotriglicéidémico y antihipertensivo (**Reddi et al., 1988; Koutsikos, 1996; Zhang, 1996; Revilla-Monsalve et al., 2006; Albarracin et al., 2007; Watanabe et al, 2008; Hemmati et al., 2009; Larrieta et al., 2010; Sahin et al., 2013; Sasaki et al., 2012; De La Vega-Monroy et al., 2013; Sahin et al., 2013; Aldahmash et al., 2016; Aguilera-Méndez y Fernandez-Mejia, 2012; Aguilera et al., 2018, 2019**). La biotina afecta el gen del receptor de asialoglicoproteína hepática (**Collins et. al., 1988**) y dos enzimas críticas del metabolismo de la glucosa: glucocinasa hepática (**Chauhan, 1991**) y fosfoenolpiruvato carboxicinas hepática (**Dakshinamurti, 1994**). La glucocinasa funciona como el sensor de glucosa, al regular la

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

tasa de glucólisis y la producción de moléculas de señalización necesarias para la secreción de insulina (**Romero, 1999**). El efecto hipoglucémico ejercido por el extracto (figura 5) infiere variaciones en la concentración de metabolitos secundarios presentes en *J. spicigera* de acuerdo a las estaciones del año, pobremente atribuido a una mayor concentración de kaempferitrin durante la temporada de primavera – verano. Sin embargo, nuestros resultados no muestran disminución de los niveles de glucemia en el grupo diabético tratado con biotina (figura 15), esto podría deberse a los mecanismos de captación de biotina intestinal cuando se administra a grandes dosis por vía oral, los cuales incluyen la difusión pasiva lenta y el proceso mediado por el portador que se producen en el intestino delgado y el colon. Como resultado, puede esperarse la saturación del transportador con dosis altas y conducir a un aumento de las pérdidas renales de biotina (**Zempleni y Mock, 1999; Said, 2012**) evitando el efecto hipoglucémico dependiente de la dosis. Por otro lado, el extracto combinado con la biotina no generó efecto hipoglucémico (figura 15). Cuando la suma de los efectos es menor que la suma matemática que se predeciría a partir de los componentes individuales, se podría hablar de un efecto antagónico (Wang *et al.*, 2011). Sin embargo, se requieren de más estudios para esclarecer estos resultados.

En la patología diabética, el bajo nivel de insulina aumenta las concentraciones de colesterol total, triacilglicéridos y la tasa de peso del hígado contra el peso corporal total final, debido a la acumulación de ácidos grasos libres que son transportados al hígado desde el tejido adiposo y secretados como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el plasma a partir de la inhibición de la lipoproteína lipasa endotelial (**Gargand Grundy, 1990; Bierman, 1992**). Nuestro estudio demostró que el extracto de *J. spicigera* obtenido durante ambas temporadas presentó compuestos con actividad hipolipemiente al disminuir los niveles séricos de TG desde los 36 días de tratamiento (figura 5) y de CT, VLDLc y LT a los 60 días de tratamiento en ratas diabéticas (Tabla 3), estos resultados podrían estar relacionados a la presencia de terpenoides como el β -Sitosterol que ha sido reportado en hojas de *J. spicigera* (**Domínguez *et al.*, 1990**) el cual, se asoció con una baja regulación de la acil-CoA: colesterol aciltransferasa 2 (ACAT 2) y de la proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos (MTTP). Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran una disminución del IAP en los grupos DEPV y DEOI (Tabla 3), evitando la posible acumulación de colesterol en la

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

aorta. Por otra parte, estudios en animales y humanos (**Raabe *et al.*, 1999; Chandler *et al.*, 2003**) han demostrado que la inhibición de MTP bloquea la secreción hepática de VLDL de modo que podría evitar el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (**Adiels *et al.*, 2008**). Además, otros estudios muestran que la supresión del diacilglicerol aciltransferasa-2 puede revertir la esteatosis hepática inducida por la dieta y la resistencia a la insulina (**Choi *et al.*, 2007**). Lo anterior pudo estar relacionado a la disminución significativa en los niveles de VLDL en suero (tabla 3) y TG hepáticos (figura 7) obtenidos en los grupos DEPV y DEOI. Por otro lado, la biotina administrada vía oral a dosis farmacológica pudo estar implicada en la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria al participar como parte del grupo protésico de acetil CoA carboxilasa que participa en el metabolismo de ácidos grasos (**Revilla *et al.*, 2006; Albarracin *et al.*, 2007; Aguilera y Fernandez, 2012; Larrieta *et al.*, 2010; Aguilera, 2018**), impidiendo la disminución de peso corporal y el aumento de peso del hígado (figura 17). Asimismo, se demostró que es capaz de disminuir de manera significativa los niveles de TG desde los 6 días de tratamiento y de VLDLc, LT e IAP a los 60 días de tratamiento (tabla 5). Por lo que en nuestro estudio, la combinación de ambos tratamientos pudo contribuir a una disminución significativa del peso del hígado en el grupo DEBPV (figura 17) relacionado a la disminución de TG hepáticos obtenidos por este mismo grupo (figura 18). Además, se mostró una disminución significativa en los niveles de TG, VLDLc, LT e IAP en los grupos diabéticos que recibieron el tratamiento con biotina combinado con extracto obtenido durante ambas temporadas.

El daño hepático es una complicación grave en la DM (**Mohamed *et al.*, 2016**). La enfermedad hepática crónica más común observada en pacientes con DM es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (**Amarapurkar, 2002**), que generalmente confiere un pronóstico benigno. Sin embargo, si no es tratado puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis y en algunos casos hasta carcinoma hepatocelular (**El-Serag, 2004**). La esteatohepatitis o la infiltración de grasa al hígado, puede ser la causa más común de elevaciones de las enzimas hepáticas (**Reid, 2001**) incluidas AST, ALT y FA en plasma, principalmente debido a la fuga de estas enzimas del citosol hepático al torrente sanguíneo (**Concepción Navarro *et al.*, 1993**). Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican colestasis intrahéptica y esteatosis hepática en el grupo diabético control y una

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

tendencia a disminuir los valores de AST, ALT, FA y GGT (Tabla 4) en ratas diabéticas tratadas con extracto obtenido durante la temporada de primavera- verano, mientras que los grupos DB, DEBPV y DEBOI presentaron una tendencia a disminuir los niveles de ALT y AST (tabla 6). Asimismo, el grupo DEBPV presentaron una disminución significativa en los niveles de FA y GGT, enzimas localizadas en la membrana canalicular del hepatocito (**Biel y gallegos., 2015**), ejerciendo un efecto sinérgico protector.

Aunque los mecanismos en el desarrollo y la progresión de las enfermedades hepáticas crónicas en la diabetes siguen siendo poco conocidos, la contribución del estrés oxidativo parece obvia. La hiperglucemia en ratas diabéticas inducidas por STZ evoca el estrés oxidativo a través de una variedad de mecanismos que eventualmente resulta en una disfunción de varios órganos y tejidos a través de la producción de ERO como el oxígeno activo y los radicales libres (**Baskol et al., 2007; Francés et al., 2011**). Los antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GPx y GR) forman la primera línea del mecanismo de defensa antioxidante para proteger al organismo del daño oxidativo mediado por ERO (**Nonaka et al., 1991**). Aunque no hay consenso sobre los cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes de diferentes órganos en ratas diabéticas, algunos estudios que miden las actividades de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa en diabetes mellitus reportaron reducciones en los niveles de estas enzimas (**Şekeroğlu et al., 2000; Coskun et al., 2005; Özkaya et al., 2008**). Sin embargo, estudios sugieren que las disminuciones en la actividad hepática de GSH y CAT en ratas observadas en animales diabéticos no tratados, pueden deberse a que CAT participa como el principal determinante del estado antioxidante de este tejido (**Wohaieb y Godin, 1987**). Los resultados obtenidos en este estudio muestran niveles de actividad de SOD (figuras 8 y 19) y CAT (figuras 9 y 20) significativamente menores en el grupo DC, así como un aumento significativo de la actividad de estas enzimas en los grupos NEPV, DEPV, NEBPV, DEBPV. Además, una tendencia a aumentar el porcentaje de GSH (figura 22) y disminuir el porcentaje de GSSG (figura 23) en el grupo DEBPV, mostrando un efecto sinérgico antioxidante.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Los datos reportados en el presente estudio sugieren que el extracto de acetato de etilo de *J. spicigera* presenta variaciones en la concentración de metabolitos secundarios de acuerdo a las condiciones ambientales. Además, el tratamiento combinado de biotina con extracto de *J. spicigera* obtenido durante la temporada de primavera – verano presenta un efecto significativo hipolipemiente y antioxidante en hígado de ratas diabéticas, por lo que muestra un potencial en el tratamiento para evitar la dislipidemia diabética y la aparición de hepatopatías de personas que padecen diabetes mellitus.

X. REFERENCIAS GENERALES

Adiels, M., Taskinen, M. R., & Borén, J. (2008). Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Current Diabetes Reports*, 8(1), 60.

Aguilera-Méndez, A. (2019). Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silente. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(6), 544-549.

Aguilera-Méndez, A., & Fernández-Mejía, C. (2012). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *Biofactors*, 38(5), 387-394.

Aguilera-Mendez, A., Hernandez-Equihua, M. G., Rueda-Rocha, A. C., Guajardo-Lopez, C., Nieto-Aguilar, R., Serrato-Ochoa, D., ... & Guzmán-Nateras, J. A. (2018). Protective effect of supplementation with biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition Research*, 57, 86-96.

Aldahmash, B. A., El-Nagar, D. M., & Ibrahim, K. E. (2016). Attenuation of hepatotoxicity and oxidative stress in diabetes STZ-induced type 1 by biotin in Swiss albino mice. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 311-317.

Amarapurkar, D., & Das, H. S. (2002). Chronic liver disease in diabetes mellitus. *Tropical gastroenterology: official journal of the Digestive Diseases Foundation*, 23(1), 3-5.

American Diabetes Association. (2019). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 41 (1): S13:S27.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Ames B N, Shigenaga M K y Hagen T M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci*. 90: 7915-7922.
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325-348.
- Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., & Komai, M. (2008). Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 756-763.
- Aoki, T. T., Benbarka, M. M., Okimura, M. C., Arcangeli, M. A., Walter Jr, R. M., Wilson, L. D., ... & Kumagai, L. F. (1993). Long-term intermittent intravenous insulin therapy and type 1 diabetes mellitus. *The Lancet*, 342(8870), 515-518.
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 547-553.
- Asociación Colombiana de Dermatología. (2009). 17: 172 – 179.
- Atkinson, M. A., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 358(9277), 221-229.
- Bandyopadhyay, U., Das, D., & Banerjee, R. K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science-Bangalore-*, 77, 658-666.
- Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2014). Uses of *Justicia spicigera* in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 401-414.
- Baskol, G., Baskol, M., & Kocer, D. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical Biochemistry*, 40(11), 776-780.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D. & Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, 13(3), 198-208.
- Benito Peinado P A, Calvo Bruzos S C, Carmén Gómez C y Iglesias Rosado C. (2014). Alimentación y nutrición en la vida activa: ejercicio físico y deporte. 1: 535-537.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Biel, F., BERNARDIN, D. M., & GALLEGOS, F. (2015). Interpretación de exámenes de laboratorio hepático y aproximación diagnóstica en pacientes con pruebas alteradas. *Recuperado Julio, 19*.

Bierman, E. L. (1992). George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 12(6), 647-656.

Bonora, E., Targher, G., Formentini, G., Calcaterra, F., Lombardi, S., Marini, F., . & Raffaelli, A. (2004). The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetic Medicine*, 21(1), 52-58.

Borboni, P., Magnaterra, R., Rabini, R. A., Staffolani, R., Porzio, O., Sesti, G., ... & Marlier, L. N. J. L. (1996). Effect of biotin on glucokinase activity, mRNA expression and insulin release in cultured beta-cells. *Acta Diabetologica*, 33(2), 154-158.

Bratic, I., & Trifunovic, A. (2010). Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6-7), 961-967.

Bugianesi, E., McCullough, A. J., & Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 42(5), 987-1000.

Burke, M. D. (1975). Liver function. *Human pathology*, 6(3), 273-286.

Calderón Salinas, J. V., Muñoz Reyes, E. G., & Quintanar Escorza, M. A. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(2), 53-66.

Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. (2010). Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *Int J Endocrinol*, 2010. pii: 205357

Castrejón V, Carbó R, Martínez M. (2010). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB*. 26(2):49-57.

Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, R. B., Santos, M., Folador, P., ... & Mena Barreto Silva, F. R. (2008). Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(10), 1032-1038.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Ceriello, A. (2000). Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, 49(2), 27-29.
- Chandler CE, Wilder DE, Pettini JL, Savoy YE, Petras SF, Chang G, Vincent J, Harwood HJ: CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans. *J Lipid Res* 2003, 44:1887-1901
- Chapman A, Cronan J. (1999). Molecular biology of attachment to proteins. *J Nutr.* 129: 447S-484S.
- Chaudoére J, Ferrari R. (1999). Intracellular antioxidants from chemical biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 37: 949 – 962.
- Chauhan, J., & Dakshinamurti, K. (1991). Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10035-10038.
- Choi, C. S., Savage, D. B., Kulkarni, A., Yu, X. X., Liu, Z. X., Morino, K., ... & Zhang, D. (2007). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22678-22688.
- Collins, J. C., Paietta, E., Green, R., Morell, A. G., & Stockert, R. J. (1988). Biotin-dependent expression of the asialoglycoprotein receptor in HepG2. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11280-11283.
- Concepcion Navarro, M., Pilar Montilla, M., Martin, A., Jimenez, J., Pilar Utrilla, M., (1993). Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus tomentosus. *Plant. Med.* 59, 312–314
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*, 51(2), 117-123.
- Dakshinamurti, K., & Cheah-Tan, C. (1968). Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46(1), 75-80.
- De La Vega-Monroy, M. L., Larrieta, E., German, M. S., Baez-Saldana, A., & Fernandez-Mejia, C. (2013). Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 169-177.

De Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T. B., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B., & Silva, F. R. M. B. (2004). Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal of Natural Products*, 67(5), 829-832.

Domínguez X A, Achenbach H, González C, Ferré-D Amore A R. (1990). Estudio químico del “muñile” (*Justicia spicigera*). *Revista Química Latinoamericana*, 21: 142-143.

El-serag, H. B., Tran, T., & Everhart, J. E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 126(2), 460-468

Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-5.

Euler, K. L., & Alam, M. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products*, 45(2), 220-221.

Federación Internacional de Diabetes. (2019) *Atlas de la Diabetes de la FID*, 9ª edición. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes.

Feillet, F., Schmitt, E., Gherardi, R., & Bonnemains, C. (2014). Enfermedades mitocondriales. *EMC-Pediatría*, 49(2), 1-12.

Fernández-Real, J. M., & Ricart, W. (1999). Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia*, 42(11), 1367-1374.

Fernández-Real, J. M., & Ricart, W. (2003). Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine reviews*, 24(3), 278-301.

Francés, D. E., Ronco, M. T., Ingaramo, P. I., Monti, J. A., Pisani, G. B., Parody, J. P., ... & Carnovale, C. E. (2011). Role of reactive oxygen species in the early stages of liver regeneration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radical Research*, 45(10), 1143-1153.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Frericks, C. T., Tillotson, I. G., & Hayman, J. M. (1950). The effect of rutin on capillary fragility and permeability. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 36, 933-939.

Fundación Mexicana para la salud hepática. (2016). El hígado y la diabetes. 22. Recuperado de: <https://www.fundhepa.org.mx/Informativo.html>

García, D. E. (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y sus formas de cuantificación. *Pastos y Forrajes*, 27(2).

García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Pascual-Teresa, S. (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A – Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3378–3384.

Garg, A., & Grundy, S. M. (1990). Management of dyslipidemia in NIDDM. *Diabetes care*, 13(2), 153-169.

Goldberg, I. J., & Ginsberg, H. N. (2006). Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 130(4), 1343-1346.

Gómez-Quiroz, L.E., Cuevas D.B., Superóxido dismutasa. (2008) Cap. 11 169-182pp. In Radicales libres y estres oxidativo, aplicaciones médicas. Konigsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 636pp.

Graham, V.A.W. (1988). Delimitation and Infra-Generic Classification of *Justicia* (Acanthaceae). *Kew Bulletin* 43 (4): 551-624.

Granados – Saánchez, D., P. Ruíz – Puga y H. Barrera – Escorcia. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(1): 51 – 63.

Hakim, Z. S., Patel, B. K., & Goyal, R. K. (1997). Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 41(4), 353-360.

Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141; 312-322.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281(1-2), 9-19.

Heinemann, T.; Kullak-Ublick, G. A.; Pietruck, B.; von Bergmann, K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1991, 40, S59-S63

Hemmati M, Babaei H, Abdolsalehei M. (2013). Survey of the effect of biotin on glycemic control and plasma lipid concentrations in type 1 diabetic patients in Kermanshah in Iran (200-2009). *Oman Med J.* 28:195– 8.

Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237-252.

Instituto Nacional de Estadística y geografía. (2018). Características de las defunciones registradas en México durante 2017 (525/18). Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>

Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., ... & Martinez, A. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(4), 250-255.

Jorge, A. P., Horst, H., de Sousa, E., Pizzolatti, M. G., & Silva, F. R. M. B. (2004). Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, 149(2-3), 89-96.

Jovanovic, S. V. S. S. (1997). Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoids in Health and Disease*, 137-161.

Kaplowitz, N., Aw, T. Y., & Ookhtens, M. (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 25(1), 715-744.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Keembiyehetty, C., Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Steer, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., & Moley, K. H. (2006). Mouse glucose transporter 9 splice variants are expressed in adult liver and kidney and are up-regulated in diabetes. *Molecular Endocrinology*, 20(3), 686-697.

Kosower EM, Kosower NS. Lest I forget thee glutathione. *Nature* 1969; 224 (5215): 117-20.

Koumanov F, Jin B, Yang J, Holman GD. (2005). Insulin signaling meets vesicle traffic of GLUT4 at a plasma-membrane-activated fusion step. *Cell Metab.* 2(3):179-89.

Koutsikos, D., Fourtounas, C., Kapetanaki, A., Agroyannis, B., Tzanatos, H., Rammos, G., & Sallum, G. (1996). Oral glucose tolerance test after high-dose iv biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Renal failure*, 18(1), 131-137.

Larkins, N. J. (1999). Free radical biology and pathology. *Journal of Equine Veterinary Science*, 19(2), 84-85.

Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López-Aceves, T., Lazo-de-la-Vega, M. L., Rojas, A., & Fernandez-Mejia, C. (2010). Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglycerides and the expression of lipogenic genes. *European Journal of Pharmacology*, 644(1-3), 263-268.

Li, T. S. C., Mazza, G., Cottrell, A. C., & Gao, L. (1996). Ginsenosides in roots and leaves of American ginseng. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 717-720.

Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2011). Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219(1), 124-133.

Lin Y, Sun Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 204(1):1-11.

Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 15(4), 203-210.

Loria, P., Lonardo, A., Bellentani, S., Day, C. P., Marchesini, G., & Carulli, N. (2007). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and cardiovascular disease: an open question. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17(9), 684-698.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Lozada, S. M., & García, L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 17(3), 172-179.

Lü, H., Chen, J., Li, W. L., Ren, B. R., Wu, J. L., & Zhang, H. Q. (2009). Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from Folium Eriobotryae. *Phytomedicine*, 16(10), 967-971.

Luque M. (2011) MAr. Diabetes Mellitus. en: Manual CTO de medicina y cirugía. CTO Editorial, España. 83 - 107.

Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-5.

Matschinsky, F. M. (1996). A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45(2), 223-241.

McCarty, M. F. (2016). In type 1 diabetics, high-dose biotin may compensate for low hepatic insulin exposure, promoting a more normal expression of glycolytic and gluconeogenic enzymes and thereby Aiding glycemic control. *Medical Hypotheses*, 95, 45-48.

McVie-Wylie, A. J., Lamson, D. R., & Chen, Y. T. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13. 1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 72(1), 113-117.

Mediavilla J. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *SEMERGEN*; 27: 132-145.

Meister A. (1988). On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci*, 13 (5): 185-8.

Miranda, C., Ela, M., Hernández Lantigua, I., & Llopiz Janer, N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 15(2), 0-0.

Mohamed, J., Nafizah, A. N., Zariyantey, A. H., & 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.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Mora, T., Sandoval, S. D. C. D., Raygoza, N. P., Martínez, M. T. S., Olalde, G. C., Bermúdez, A. R., & López, M. G. (2016). Propiedades hipoglucemiantes de la especie *Justicia spicigera* Schlechtendal (Scrophulariales: Acanthaceae). *Métodos en Ecología y Sistemática*, 11(1), 24-33.
- Morison, J. I. L., & Lawlor, D. W. (1999). Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell & Environment*, 22(6), 659-682.
- Mulhall, B. P., Ong, J. P., & Younossi, Z. M. (2002). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(11), 1136-1143.
- Nonaka, A., Manabe, T., & Tobe, T. (1991). Effect of a new synthetic ascorbic acid derivative as a free radical scavenger on the development of acute pancreatitis in mice. *Gut*, 32(5), 528-532.
- Nordlie, R. C., Foster, J. D., & Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition*, 19(1), 379-406.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Informe mundial sobre la diabetes. Recuperado de: <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>
- Ortiz-Andrade R, Cabanas-Wuan A, Arana-Argáez V E, Alonso-Castro A J, Zapata-Bustos R, Salazar-Olivo L A, Domínguez F, Chávez M, Carranza-Álvarez C, García-Carranca A. **2012**. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae) *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 455-462.
- Özkaya, Y. G., Ag, A., Yargıçog, P., Hacıoglu, G., Bilmen-Sarikçiog, S., Özen, I., & Alicigüzel, Y. (2008). The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analyses of Glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; 333 (1): 19-39
- Peraza-Reyes L. (2008). Catalasa, Radicales libres y estrés oxidativo, In: aplicaciones médicas. Königsberg F. M. Compiladora. El manual moderno. 183-199.
- Pérez-Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Powers A. (2012). Diabetes mellitus. Harrison. Principios de medicina Interna (Harrison, Longo, Fauci, Kasper, Hauser, Jameson, Lozano, Eds). McGraw-Hill Interamericana editors, S.A. de C.V, China. 2968-3003.

Raabe, M., Véniant, M. M., Sullivan, M. A., Zlot, C. H., Björkegren, J., Nielsen, L. B., ... & Young, S. G. (1999). Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(9), 1287-1298.

Radušienė, J., Karpavičienė, B., & Stanius, Ž. (2012). Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's wort. *Botanica Lithuanica*, 18(2), 101-108.

Raftos, J. E., Whillier, S., & Kuchel, P. W. (2010). Glutathione Synthesis and Turnover in the Human Erythrocyte Alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23557-23567.

Rajkumar, L., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., & Govindarajulu, P. (1991). Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29(11), 1081-1083.

Rakel, D. (2017). *Integrative medicine-E-book*. Elsevier health sciences.

Ramakrishna A, Ravishankar GA, 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1720–1731.

Recuperado (25, Octubre, 2019) de la base de datos en línea Integrated Taxonomic Information System (ITIS), https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=507036#null

Reddi, A., DeAngelis, B., Frank, O., Lasker, N., & Baker, H. (1988). Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life sciences*, 42(13), 1323-1330.

Reid, A. E. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 121(3), 710-723.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Revilla-Monsalve, C., Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Báez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M. A., Hernández-Quiróz, P. M., & Fernandez-Mejia, C. (2006). Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(4), 182-185.

Revilla-Monsalve, C., Zendejas-Ruiz, I., Islas-Andrade, S., Báez-Saldaña, A., Palomino-Garibay, M. A., Hernández-Quiróz, P. M., & Fernandez-Mejia, C. (2006). Biotin supplementation reduces plasma triacylglycerol and VLDL in type 2 diabetic patients and in nondiabetic subjects with hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(4), 182-185.

Reyes, A., Galicia, M., Carrillo, M. (2011). Antioxidantes: la magia de lo natural. *Rev Tlatemoani*. (8): 1-16.

Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, Trujillo López Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit*. 30:36-44.

Romero-Navarro, G., Cabrera-Valladares, G., German, M. S., Matschinsky, F. M., Velazquez, A., Wang, J., & Fernandez-Mejia, C. (1999). Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology*, 140(10), 4595-4600.

Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Kucuk, O., Ozercan, I. H., ... & Komorowski, J. R. (2013). Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *British Journal of Nutrition*, 110(2), 197-205.

Said, H. M. (2012). Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. In *Water Soluble Vitamins* (pp. 1-19). Springer, Dordrecht.

Sánchez-Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Nuñez VM. (2004). Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*, 29:81-90.

- Sasaki, Y., Sone, H., Kamiyama, S., Shimizu, M., Shirakawa, H., Kagawa, Y., ... & Furukawa, Y. (2012). Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food & Function*, 3(4), 414-419.
- Sastre J, Pallardo FV, Viña J. (2005). Glutathione. *The Handbook of Environm Chem*, 2: 91–108.
- Schäuble, S., Stavrum, A. K., Puntervoll, P., Schuster, S., & Heiland, I. (2013). Effect of substrate competition in kinetic models of metabolic networks. *FEBS Letters*, 587(17), 2818-2824.
- Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, *et al.* (2005). Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol.* 22(4):339-51.
- Şekeroğlu, M. R., Sahin, H., Dülger, H., & Algün, E. (2000). The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry*, 33(8), 669-674.
- Sepúlveda, G., H. Porta Ducoing y M. Rocha Sosa. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3): 355 – 363.
- Sharma, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2008). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2376-2383.
- Smeds, A. I., Eklund, P. C., & Willför, S. M. (2012). Content, composition, and stereochemical characterisation of lignans in berries and seeds. *Food Chemistry*, 134(4), 1991-1998.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Sone, H., Ito, M., Shimizu, M., Sasaki, Y., Komai, M., & Furukawa, Y. (2000). Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(3), 550-554.
- Suckling, K. E., & Stange, E. F. (1985). Role of acyl-CoA, cholesterol acyl-transferase in cellular cholesterol metabolism. *Journal of Lipid Research*, 26, 647-671.
- Symeonidis, T., Chamilos, M., Hadjipavlou-Litina, D. J., Kallitsakis, M., & Litinas, K. E. (2009). Synthesis of hydroxycoumarins and hydroxybenzo [f]-or [h] coumarins as lipid peroxidation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(4), 1139-1142.
- Szakiel, A., Pączkowski, C., & Henry, M. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10(4), 471-491.
- Tao, W. U., Tiecheng, P. A. N., ZHENG, Z., Tao, C. H. E. N., & Youmin, P. A. N. (2008). Relationship between Glut-1, Glut-3 expression and fluorodeoxyglucose uptake in NSCLC and benign pulmonary lesion. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 11(4).
- Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155.
- Tuppen, H. A., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(2), 113-128.
- Tzeng, Y. M., Chen, K., Rao, Y. K., & Lee, M. J. (2009). Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *European Journal of Pharmacology*, 607(1-3), 27-34.
- Van Belle, T. L., Coppieters, K. T., & Von Herrath, M. G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological Reviews*, 91(1), 79-118.
- Vega-Avila, E., Tapia-Aguilar, R., Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Pérez-Flores, J., & Velasco-Lezama, R. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Justicia spicigera*. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 75-82.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana De Medicina Militar*, 31(2), 126-133.

Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.

Vilches-Flores, A., Tovar, A. R., Marin-Hernandez, A., Rojas-Ochoa, A., & Fernandez-Mejia, C. (2010). Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(7), 606-612.

Vinson, J. A., & Jang, J. (2001). In vitro and in vivo lipoprotein antioxidant effect of a citrus extract and ascorbic acid on normal and hypercholesterolemic human subjects. *Journal of Medicinal Food*, 4(4), 187-192.

Wang, H., & Oster, G. (1998). Energy transduction in the F₁ motor of ATP synthase. *Nature*, 396(6708), 279.

Wang, S., Meckling, K. A., Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 960-968.

Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y., & Komai, M. (2008). Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 756-763.

Wattel, A., Kamel, S., Mentaverri, R., Lorget, F., Prouillet, C., Petit, J. P., ... & Brazier, M. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, 65(1), 35-42.

Whitfield, J. B., Pounder, R. E., Neale, G., & Moss, D. W. (1972). Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gut*, 13(9), 702-708.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

- Wohaieb, S. A., & Godin, D. V. (1987). Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat: effects of insulin treatment. *Diabetes*, 36(9), 1014-1018.
- Wu, L., & Parhofer, K. G. (2014). Diabetic dyslipidemia. *Metabolism*, 63(12), 1469-1479.
- Xingyuan, H. E., Huang, W., Wei, C. H. E. N., Tian, D. O. N. G., Changbing, L. I. U., Zhenju, C. H. E. N., ... & Yanan, R. U. A. N. (2009). Changes of main secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* in response to ozone fumigation. *Journal of Environmental Sciences*, 21(2), 199-203.
- Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(3), 515-527.
- Yan, L. J. (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology*, 2, 165-169.
- Yardim-Akaydin, S., Sepici, A., Özkan, Y., Torun, M., Şimşek, B., & Sepici, V. (2004). Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: is allantoin a marker of oxidative stress?. *Free Radical Research*, 38(6), 623-628.
- Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F., & Nawata, H. (2002). Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 51(2), 163-168.
- Youngson, R. (2003). *Antioxidantes y radicales libres* (Vol. 132). Edaf.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139-162.
- Zafar, M., Naqvi, S. N. U. H., Ahmed, M., & Kaimkhani, Z. A. (2009). Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *International Journal of Morphology*, 27(3).
- Zempleni, J., & Mock, D. M. (1999). Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 504-508.

**“Efecto del extracto de acetato de etilo de
Justicia spicigera y la biotina en hígado de ratas diabéticas”**

Zhang, H., Osada, K., Maebashi, M., Ito, M., Komai, M., & Furukawa, Y. (1996). A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 42(6), 517-526.

Zhi-lin, Y., Chuan-chao, D., & Lian-qing, C. (2007). Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*, 6(11).