



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

TESIS:

**“Evaluación del efecto hipoglucemiante y neuroprotector de la
administración oral de *Spathodea campanulata* en ratas diabética”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

P R E S E N T A:

Química Farmacobióloga
María del Socorro Escamilla Barrera

Directora de tesis:

Doctora en Ciencias Fisiológicas
Bertha Fenton Navarro

Co-director de tesis:

Doctor en Ciencias Biomédicas
José Miguel Cervantes Alfaro

Morelia, Michoacán, México
Agosto, 2019

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad – CONACYT.

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias de la Salud.

Registro de Becario: 618557

CVU: 816625

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
aprobó la tesis presentada por:

Química Farmacobióloga
María del Socorro Escamilla Barrera

Doctora en Ciencias Fisiológicas

María de la Luz Torner Aguilar

Doctor en Ciencias (Biología celular)

Carlos Cortés Penagos

Doctora en Ciencias en la Especialidad de Farmacología

Marcia Yvette Gauthereau Torres

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Glicobiología

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A cargo de **D. en C. Bertha Fenton Navarro**

Laboratorio de Histopatología

Unidad de Servicios Auxiliares de Diagnostico

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A cargo de **M. en C. Manuel López Rodríguez**

Laboratorio de Neurociencias

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A cargo de **D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro**

DEDICATORIAS

A la memoria de mi madre, **Ma. Georgina Barrera Espinosa**, por haber sido el mejor ejemplo, la impulsora de mis sueños y la persona que más he amado.

Nos volveremos a encontrar.

DEDICATORIAS

A Francisco Escamilla A. por inculcarme el deseo de superación personal y profesional, por el apoyo y la confianza depositada en cada decisión de mi vida. Te amo.

A Elizabeth E.B, Cesar E. E.B y Francisco E.B, mis hermanos, por ser tan hermosos cómplices en este camino y por darme fuerza para continuar con mi proyecto de vida. Los amo.

A Lizbeth López L. y a Eduardo Mora D., mi familia tarandacuense, por ser siempre inspiración y admiración, por nunca dudar de mis habilidades. Caminar la vida de sus manos es mi mayor recompensa.

A Andrea Rico P., Daniela García y Rosario Gómez., mis colegas de laboratorio, por haber compartido esta aventura, brindarme su sincera amistad y preciados consejos. Por ustedes el trayecto siempre fue más ameno.

A Alondra Ayala S., Jose Luis Serna V. y Laura García Q., mis hermanos de generación, no fue fácil sin embargo, su valiosa presencia aminoro cada trago amargo de este camino, aprendí tanto de ustedes, les debo parte de mi madurez personal y profesional. Son el mejor regalo de este recorrido llamado maestría, los adoro.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

A la División de Estudios de Posgrado de Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.

A mi directora de tesis, D. en C. Bertha Fenton Navarro, ya que con su guía, apoyo y ejemplo, me han otorgado las armas para estructurar un pensamiento científico, además de ampliar la visión de mi vida, gracias por su tiempo, paciencia y enseñanzas; por otorgarme un lugar en el laboratorio de Glicobiología.

A mi director de tesis, D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro, por haberme dado un espacio, compartido su conocimiento, y otorgado parte de su tiempo.

A mi comité tutorial, D. en C. María de la Luz Torner Aguilar, D. en C. Carlos Cortés Penagos y a la D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres, por aceptar ser parte de este proyecto, por sus acertadas observaciones y sugerencias.

Al M. en C. Manuel López Rodríguez, por dedicarme su tiempo y su atención, por sus amenas pláticas y ser un apoyo en cualquier circunstancia para concluir con este proyecto.

Al MVZ. Adrián Sánchez Orozco y a todo el personal de la Unidad de Servicios Auxiliares de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH, por las facilidades otorgadas para el desarrollo del proyecto y por la gran amabilidad a lo largo de mi estadía.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iv
Lista de abreviaturas	v
Glosario de términos	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
I. Introducción	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Clasificación de diabetes mellitus	2
1.1.1.1 Diabetes mellitus tipo 1	2
1.1.1.2 Diabetes mellitus tipo 2	2
1.1.1.3 Diabetes gestacional	2
1.1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus	2
1.1.3 Mecanismos de daño tisular en diabetes mellitus	3
1.1.3.1 Vía del sorbitol	3
1.1.3.2 Acción de productos de glicación avanzada	3
1.1.3.3 Vía de la proteína quinasa C	4
1.1.4 Complicaciones de diabetes mellitus en el sistema nervioso central	4
1.2 Las plantas medicinales: efectos hipoglucemiante y neuroprotector	6
1.3 Galeana (<i>Spathodea campanulata</i>)	10
1.4 Alteraciones en el aprendizaje y cambios morfológicos del hipocampo, en presencia de diabetes mellitus	10
II. Justificación	15
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	16

V. Material y métodos	17
5.1 Obtención de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y clasificación taxonómica	17
5.2 Obtención de extractos de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	17
5.2.1 Obtención del extracto acuoso (EAQSC)	17
5.2.2 Obtención de extracto acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC)	17
5.3 Cuantificación de metabolitos secundarios	18
5.3.1 Cuantificación de fenoles totales	18
5.3.2 Cuantificación de polifenoles	18
5.3.3 Cuantificación de flavonoides	18
5.3.4 Determinación <i>in vitro</i> de actividad antioxidante	19
5.4 Modelo animal	19
5.4.1 Inducción de diabetes experimental	20
5.4.2 Administración aguda y crónica de extractos/fármacos	20
5.4.3 Administración aguda	21
5.4.3.1 Métodos para evaluar la capacidad hipoglucemiante de plantas	21
5.4.3.1.1 Curva de tolerancia a la glucosa	21
5.4.3.1.2 Curva de glucosa en ayuno	22
5.4.4 Administración crónica	22
5.4.4.1 Peso de los animales y glucosa sanguínea	22
5.4.4.2 Hemoglobina glicosilada	23
5.4.4.3 Evaluación de los parámetros de orina	23
5.5 Procesamiento histológico de cerebros	27
5.5.1 Conteo de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo	27
5.6 Análisis estadístico	28

VI. Resultados	29
6.1 Cuantificación de fenoles totales, polifenoles y flavonoides	29
6.2 Determinación de actividad antioxidante <i>in vitro</i>	32
6.3 Modelo experimental de diabetes	33
6.4 Evaluación de la capacidad hipoglucemiante del extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	35
6.4.1 Curvas de tolerancia a la glucosa	35
6.4.2 Curvas de glucosa en ayuno	45
6.5 Administración crónica del extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	46
6.5.1 Peso de los animales y glucosa sanguínea	46
6.5.2 Hemoglobina glicosilada	49
6.5.3 Evaluación de los parámetros de orina	50
6.6 Evaluación de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo	53
VII. Discusión	58
VIII. Conclusiones	66
IX. Perspectivas	67
X. Referencias	68
XI. Anexos	79

Índice de figuras

No.		Pág.
1	Mecanismos de daño activados en presencia de diabetes mellitus	5
2	Síntesis de metabolitos secundarios de plantas	7
3	Órganos diana y mecanismos de acción de compuestos secundarios de plantas	9
4	Curva patrón de ácido gálico	28
5	Curva patrón de floroglucinol	29
6	Curva patrón de quercetina	30
7	Porcentaje de inhibición de DPPH por ácido ascórbico y extractos de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	32
8	Glucosa sanguínea en la inducción del modelo experimental de diabetes tipo 2	33
9	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en ratas sanas	35
10	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en modelo de diabetes tipo 2	36
11	Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea en animales diabéticos administrados con el extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	37
12	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acetónico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en animales sanos	38
13	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acetónico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en modelo de diabetes tipo 2	39
14	Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea con el extracto acetónico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	40
15	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en animales sanos	40

16	Curva de tolerancia a la glucosa con extracto alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en modelo de diabetes tipo 2.	43
17	Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea en animales diabéticos con el extracto alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	43
18	Curva de glucosa en ayuno con extractos acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> en modelo de diabetes tipo 2	45
19	Peso de animales durante la administración crónica de extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina	46
20	Glucosa sanguínea correspondiente a la administración crónica del extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina	47
21	Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea de administración crónica con el extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina	47
22	Glucosa sanguínea correspondiente al inicio y final de la administración crónica de extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina	48
23	Hemoglobina glicosilada de los grupos experimentales posterior a la administración crónica de extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina	49
24	Proteínas en orina de los grupos experimentales en administración crónica de extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina	51
25	Cetonas en orina de los grupos experimentales en administración crónica de extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina.	51
26	Hemoglobina en orina de los grupos experimentales en administración crónica de extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> y metformina.	52

27	Cortes histológicos del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales	53
28	Número de neuronas piramidales íntegras	55
29	Número de neuronas piramidales lesionadas	56

Índice de tablas

No.		Pág.
1	Parámetros de orina y sus características	23
2	Contenido de fenoles presentes en extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	28
3	Contenido de polifenoles presentes en extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	29
4	Contenido de flavonoides presentes en extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	30
5	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de extracto de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	31
6	Parámetros de sangre y orina en la inducción por fructosa 60% al modelo de diabetes tipo 2	33
7	Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa del extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	35
8	Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa del extracto acetónico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	38
9	Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa del extracto alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i> .	42
10	Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa de extractos de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	44
11	Parámetros de orina al inicio y final del tratamiento crónico con extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	50
12	Número de neuronas íntegras y porcentajes en el segmento CA1 del hipocampo	54
13	Número de neuronas lesionadas y porcentajes en el segmento CA1 del hipocampo	56

Lista de abreviaturas

HbA1c	Hemoglobina glicosilada	MMSE	Mini Evaluación de Estado Mental
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	HDS-R	Evaluación en la Escala de Demencia Hasegawa
DM1	Diabetes mellitus tipo 1	LTP	Expresión de potenciación a largo plazo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2	HFCS-55	Jarabe de maíz con alta fructuosa al 55%
CTOG	Curva de tolerancia oral a la glucosa	GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
O₂⁻	Radical superóxido	rpm	Revoluciones por minuto
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	PVPP	Polivinilpolipirrolidona
OH⁻	Hidroxilo	AlCl₃	Tricloruro de aluminio
DNA	Ácido desoxirribonucleico	mgEAG/g	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto
AR	Aldosa reductasa	mgEF/g	Miligramos equivalentes de floroglucinol por gramo de extracto
AGE	Agentes de glicación avanzada	mgEQ/g	Miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto
DHAP	Dihidroxi acetona fosfato	EC₅₀	Cantidad necesaria de antioxidante para reducir en un 50% la
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato		
DAG	Diacilglicerol		
PKC	Proteína cinasa C		
cAMP	Adenosin monofosfato		
BACS	Breve evaluación de la cognición en la esquizofrenia		
MoCA	Evaluación Cognitiva de Montreal		

	concentración inicial de DPPH	ERK 1/2	Proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señal extracelular
TEC₅₀	Tiempo necesario para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH	eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EA	Eficiencia antirradical	PPAR-γ	Receptor γ activado por proliferador de peroxisomas
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil	IRS-2	Sustrato receptor de insulina 2
EAQSC	Extracto acuoso de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	GLUT-4	Transportador de glucosa 4
EASC	Extracto acetónico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	IL-6	Interleucina 6
EOHSC	Extracto alcohólico de hojas de <i>Spathodea campanulata</i>	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
ROS	Especies reactivas de oxígeno	NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP	JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
PGC-1α	Proteína 1- α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas		

Glosario de términos

Glucosa	Monosacárido, fuente primaria de síntesis de energía de las células.
Glucemia	Presencia de glucosa en sangre.
Hiperglucemia	Aumento anormal de los valores de glucosa en sangre.
Hipoglucemiante	Sustancia que tiene la capacidad de disminuir los valores de glucosa en sangre.
Radical libre	Especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos.
Metabolito secundario	Compuesto de naturaleza química diversa producto del metabolismo primario.
Antioxidante	Átomo o molécula que interactúa directamente con el agente oxidante formando un radical menos activo o que interfiere en la cadena de reacciones.
Neuroprotector	Compuesto que previene, mitiga o retrasa los procesos neurodegenerativos.

Resumen

Introducción. La diabetes y sus complicaciones son parte del grupo de enfermedades crónico degenerativas, que constituyen un problema de salud a nivel mundial. Plantas como *Spathodea campanulata*, son conocidas en la medicina tradicional africana por su eficacia hipoglucemiante en el tratamiento de la diabetes. **Objetivo.** Evaluar el efecto hipoglucemiante de la administración oral de *Spathodea campanulata* en ratas con diabetes tipo 2 y evaluar el efecto neuroprotector en neuronas piramidales del CA1 del hipocampo. **Materiales y métodos.** Hojas de *Spathodea campanulata*, se obtuvo el extracto acuoso (EAQSC), acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC); se cuantificó su contenido de fenoles, polifenoles, flavonoides y se evaluó la actividad antioxidante *in vitro*. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar a partir de 100 g. Los animales fueron aleatorizados en grupos (n=6): Sanos y diabéticos con los distintos extractos. Se realizó el análisis histológico de cerebros, para evaluar la población de neuronas piramidales (segmento CA1) del hipocampo. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza ANOVA y prueba de Tukey *post hoc*. **Resultados.** El EAQSC tiene concentración media de metabolitos secundarios, en capacidad antioxidante, el EAQSC y el EASC tienen elevada y el EOHSC mediana eficiencia antirradical. La dosis óptima del EAQSC fue 300 mg/kg, con reducción de la glucemia del 22.6%. El EASC en dosis de 4mg/kg, redujo 16.6%. El EOHSC en dosis de 4mg/kg un 20.5%. La reducción de glucosa al finalizar la administración crónica fue del 8.43% y la HbA1c de 5.24%. En el análisis de las neuronas lesionadas, el grupo diabético presenta un incremento del 100%, en comparación con el grupo sano de 0%, los grupos diabéticos tratados con metformina y extracto presentan un 64.21 y 58.84% respectivamente. **Conclusión.** El extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* confiere un efecto antioxidante, hipoglucemiante y neuroprotector en animales diabéticos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, hipoglucemiante, antioxidante, neuroprotector, *Spathodea campanulata*.

Abstract

Introduction. Diabetes and its complications are part of the group of chronic degenerative diseases, which have a significant health problem worldwide. Plants such as *Spathodea campanulata*, are known in traditional African medicine for their hypoglycemic efficacy in the treatment of diabetes. **Objective.** To assess the effect of oral administration of *Spathodea hypoglycemic campanulata* in rats with type 2 diabetes and assess the neuroprotective effect in pyramidal neurons of the CA1 of the hippocampus. **Materials and methods.** Aqueous (EAQSC), acetic (EASC) and alcoholic extract (EOHSC) were obtained from *Spathodea campanulata* leaves. The content of phenols, polyphenols, and flavonoids was quantified. The antioxidant activity was evaluated *In vitro*. Male Wistar rats (from 100g) were used. The animals were randomized into groups (n = 6): Healthy and diabetic with different extracts. Histological analysis of brains was performed to evaluate the population of CA1 pyramidal neurons of the hippocampus. The results were analyzed by ANOVA analysis of variance and post hoc Tukey test. **Results.** The EAQSC has a medium concentration of secondary metabolites. In antioxidant capacity, the EAQSC and the EASC have a high and the EOHSC medium anti-radical efficiency. The optimal hypoglycemic dose of EAQSC was 300 mg/kg, with blood glucose reduction of 22.6%. The EASC in doses of 4mg/kg reduced 16.6%. The EOHSC in doses of 4mg/Kg 20.5%. The glucose reduction at the end of chronic administration was 8.43% and HbA1c 5.24%. The number of whole neurons of the healthy group (100%), the group with diabetes mellitus 2 a total of 60.2% of integral neurons, after the chronic treatment the diabetic group with metformin 100 mg/kg at a percentage of 74.67 % and the diabetic group with EAQSC obtained 73.28%, no differences were found between the diabetic control group and the treated diabetic groups. In the analysis of injured neurons, the diabetic group presents a 100% increase, compared with the healthy group of 0%, the diabetic groups treated with metformin and extract presented a 64.21 and 58.84% respectively. **Conclusion.** The aqueous extract of leaves of *Spathodea campanulata* has an antioxidant effect, hypoglycemic and neuroprotective in diabetic animals.

Keywords: Diabetes mellitus, hypoglycemic, antioxidant, neuroprotective, *Spathodea campanulata*

I. Introducción

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus se ha definido como un grupo de alteraciones metabólicas, caracterizado por la presencia de hiperglucemia, como resultado de alteración en la secreción y/o la acción de la insulina. La hiperglucemia crónica se asocia con disfunción multiorgánica, especialmente en ojos, riñones, nervios, el corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2014 ^[a]; International Diabetes Federation, 2017).

La diabetes mellitus se diagnostica bajo los criterios de glucosa en plasma, en ayunas ≥ 126 mg/dL, o ≥ 200 mg/dL dos horas después de una prueba de tolerancia a la glucosa. En el año 2018 la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes y la Federación Internacional de Diabetes, incluyó como tercera prueba de diagnóstico a la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) $\geq 6,5\%$ (American Diabetes Association, 2014 ^[b]; International Diabetes Federation, 2017).

A nivel mundial en el año 2017 se identificaron 425 millones de personas con diabetes mellitus y se consideró a dicha enfermedad, como causa de 4 millones de defunciones anuales, que representan el 10,7% de la mortalidad mundial. En México, en el año 2016 existían 6.4 millones de personas diagnosticadas, con una prevalencia de 9.4% (mayor que la observada en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el año 2006, 7% y en el año 2012, 9.2%) del total de la población, siendo ligeramente mayor en las mujeres. La diabetes representa la segunda causa de defunciones en el país. En Michoacán se reporta un total de 40,013 personas con diabetes (Hernández et al., 2016; Rojas et al., 2017; International Diabetes Federation, 2017; Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles, 2018).

1.1.1 Clasificación de diabetes mellitus

1.1.1.1 Diabetes mellitus tipo 1

Es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, lo que ocasiona una deficiencia absoluta de insulina. Representa el 5-10% de las personas con Diabetes (American Diabetes Association, 2014 [a]; International Diabetes Federation, 2017).

1.1.1.2 Diabetes mellitus tipo 2

Representa 90 - 95% de las personas con diabetes, caracterizada por la resistencia a las acciones de la insulina, así como deficiencia y defecto en la secreción de la hormona. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física (American Diabetes Association, 2014 [a]; International Diabetes Federation, 2017).

1.1.1.3 Diabetes gestacional

Definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se presente durante el embarazo (American Diabetes Association, 2014 [a]; International Diabetes Federation, 2017).

1.1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus.

No obstante la esperanza de vida del paciente con diabetes mellitus es en general grande, el curso a largo plazo de esta patología tiene el riesgo de complicaciones, que afectan principalmente las redes vasculares, microvasculares y macrovasculares. Las complicaciones microvasculares pueden dar lugar a la nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética. Las complicaciones macrovasculares, se caracterizan por originar padecimientos como la aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón, que son una de las principales causas de muerte en el paciente diabético (Díaz et al., 2004; Acosta et al., 2011; American Diabetes Association, 2014 [b]).

1.1.3 Mecanismos de daño tisular en diabetes mellitus

Se ha mostrado que la hiperglucemia, genera una producción anormalmente grande de radicales libres, principalmente de anión superóxido (O_2^-), lo que puede dar por resultado el daño por estrés oxidativo. El estrés oxidativo está involucrado en la apoptosis de las células β pancreáticas y la resistencia a la insulina. Los radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo (OH^-) se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa, estos ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del DNA (Evans et al., 2002; Díaz et al., 2004; Acosta et al., 2011).

1.1.3.1 Vía del sorbitol.

También conocida como la vía de los polioles. Es fundamental en la degradación de la glucosa por la aldosa reductasa (AR), esta enzima se localiza en tejidos que no requieren insulina para la captación de glucosa, como: el epitelio corneal, cristalino y pericitos retinales, en el ojo; riñón el epitelio tubular, los podocitos, y las células mesangiales, en el riñón, y los axones y las células de Schwann, en los nervios periféricos. Cuando la glucosa aumenta la AR se encarga de reducirla a sorbitol. La sobreproducción de sorbitol ocasiona edema celular y axonal por el aumento en la presión osmótica intracelular y bloqueo de la actividad de la ATPasa sodio/potasio en las fibras nerviosas (Díaz et al., 2004; Acosta et al., 2011).

1.1.3.2 Acción de productos de glicación avanzada.

La glicosilación o glicación de proteínas resulta de la unión mediante enlace covalente entre la glucosa y el grupo ϵ -amino de la lisina de las proteínas plasmáticas y tisulares, o el grupo α -amino terminal de la cadena polipeptídica. El nivel de glicosilación dependerá de la concentración de glucosa y del tiempo de vida media de la proteína. Cuando se glicosilan proteínas de larga vida, como colágeno, sufren reordenaciones irreversibles para formar compuestos más estables, los llamados productos de la glicación avanzada. Durante la formación

de los agentes de glicación avanzada (AGE), las proteínas modifican su función, así como su estructura secundaria y terciaria, lo que conlleva a cambios en la permeabilidad de las membranas basales. Antes de la formación de los AGE se generan diferentes intermediarios o precursores que también son tóxicos, como el metilglioxal (Díaz et al., 2004; Acosta et al., 2011).

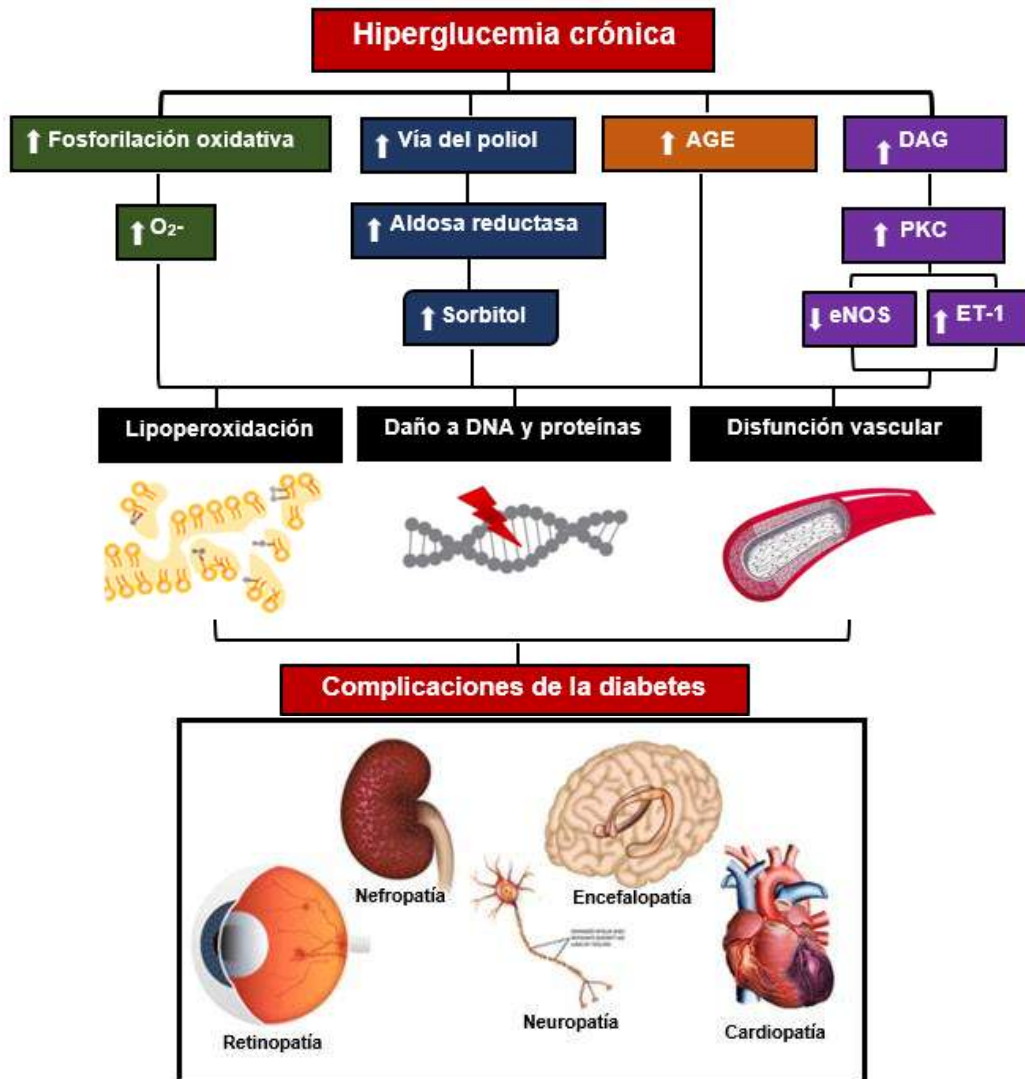
1.1.3.3 Vía de la proteína cinasa C.

La acumulación de DHAP (dihidroxi acetona fosfato) y G3P promueve la producción de DAG (diacilglicerol), y la subsecuente activación de la PKC (proteína quinasa C). La PKC es una enzima que tiene 11 isoformas que son importantes en la homeostasis vascular (Díaz M, 2004). En estado de hiperglucemia, la actividad de las isoformas α , β y δ de la PKC aumenta en las células endoteliales de retina y riñón debido a un incremento en la concentración de DAG. Cuando la PKC es activada, la producción de la eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) disminuye mientras que el vasoconstrictor ET-1 (endotelina-1) aumenta, provocando alteraciones del flujo sanguíneo (Díaz et al., 2004; Acosta et al., 2011).

1.1.4 Complicaciones de diabetes mellitus en el sistema nervioso central

El sistema nervioso central es rico en ácidos grasos insaturados y hierro (Fe^{3+}), dicho contenido de lípidos sumado a su alta actividad metabólica lo hace vulnerable al daño oxidativo. En 1922 se reconoció que la diabetes puede conducir a la disfunción cognitiva, dicha disfunción se caracteriza en pacientes diabéticos en la disminución de la velocidad de ejecución de procesos mentales. Los cambios en las vasos cerebrales, las alteraciones en la señalización de insulina (resistencia a la insulina), el estrés oxidativo, la acumulación de productos de glicación avanzada, los episodios de hipoglucemia y las alteraciones en el metabolismo amiloide, pueden ser los mecanismos por los cuales la DM afecta al cerebro, conduciendo a neuroinflamación y pérdida de funciones cognoscitivas (Mijnhout et al., 2006; Martínez et al., 2010; Bornstein et al., 2014). Diversas áreas del cerebro se ven afectadas por la presencia de hiperglucemias crónicas y sus

complicaciones, el hipocampo específicamente el área CA1 del cuerpo de Ammon se muestra muy susceptible a cambios en las redes vasculares y en el flujo sanguíneo cerebral, así como al aumento desproporcionado de especies reactivas de oxígeno (Farkas et al., 2007). En la figura 1 se muestran mecanismos de daño activados por la presencia de hiperglucemia crónica característica de diabetes mellitus.



Adaptado de Acosta et al., 2011; Bandeira et al., 2013

Figura 1. Mecanismos de daño activados en presencia de diabetes mellitus.

O₂⁻ (anión superóxido), AGE (productos de glicación avanzada), DAG (diacilglicerol), PKC (proteína cinasa C), eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial), ET-1 (endotelina-1), DNA (ácido desoxirribonucleico).

1.2 Las plantas medicinales: efectos hipoglucemiante y neuroprotector.

Actualmente, los reportes indican la existencia de literatura científica que avala el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos contra diversas enfermedades como la diabetes, la hipertensión y el cáncer, o con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiprotozoarias, relajantes y sedantes México posee una rica tradición en el empleo de las plantas medicinales entre sus varias prácticas curativas populares. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico (Esquivel et al., 2012).

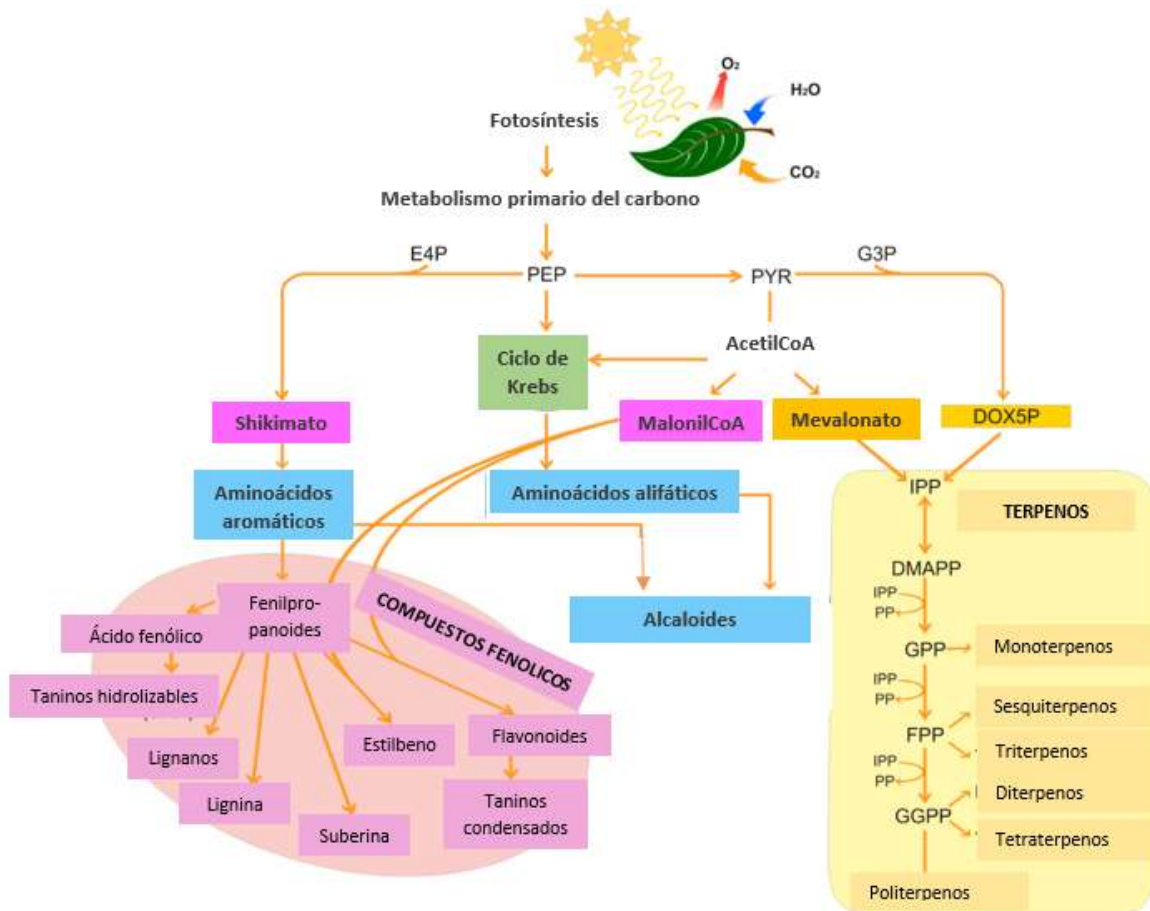
Las plantas contienen glucósidos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, carotenoides, entre otros productos de su metabolismo, que se encuentran implicados en el efecto antidiabético. Con base en información etnobotánica, se sugiere que alrededor de 800 plantas poseen potencial antidiabético probado en diferentes técnicas experimentales (Patel et al., 2012).

Los metabolitos secundarios de las plantas que presentan un efecto antidiabético, se pueden clasificar en tres grandes grupos. 1. Terpenoides, formados en la ruta del ácido mevalónico. 2. Compuestos fenólicos y sus derivados, se sintetizan por la ruta del ácido shikímico o por la del malonato. 3. Alcaloides, contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. En la figura 2 se muestran las rutas de síntesis de metabolitos primarios y secundarios de las plantas (Ávalos y Pérez, 2009).

Los compuestos fenólicos, se encuentran presentes en alimentos de origen vegetal, como té, café, vino, cereales, verduras, legumbres, frutas y bayas. La diversidad estructural de los fenoles va desde un simple fenol hasta grandes macromoléculas poliméricas. Producen colores de naranja a azul en pétalos, frutas, hojas, y raíces (Delgado-Vargas et al., 2000; Ovaskainen et al., 2008).

Un grupo esencial de los compuestos fenólicos son los flavonoides, que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y

poseen así excelentes propiedades de quelación, lo que les confiere una importante capacidad antioxidante. Por este hecho se han descrito efectos protectores en patologías como la diabetes mellitus y sus complicaciones (Martínez-Flórez et al., 2002; Sattanathan, et al., 2011).



Adaptado de Borrelli and Trono, 2016.

Figura 2. Síntesis de metabolitos secundarios de plantas. E4P (eritrosa 4-fosfato), G3P (gliceraldehído 3-fosfato), PEP (fosfoenolpiruvato); PYR (piruvato); DOX5P (1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato), IPP (pirofosfato de isopentenilo), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), PP (pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato), GGPP (geranilgeranil pirofosfato).

Los compuestos resultantes del metabolismo secundario de las plantas secundarios favorecen la homeostasis de la glucosa a través de varios mecanismos. Entre estos se han descrito la estimulación de la secreción de insulina por obstrucción de los canales de K⁺ en las células β de los islotes pancreáticos, la estimulación de la glucogénesis y glicolisis, inhibición de la gluconeogénesis y glucogénesis, aumento en la captación de glucosa en tejidos periféricos estimulando la vía de señalización de inositol trifosfato (IP3), favoreciendo la translocación de GLUT-4 y la modulación de absorción de glucosa desde el intestino inhibiendo la actividad de α -amilasa y α -glucosidasa (Hanhineva et al., 2010; Kim et al., 2016; Laguna et al., 2017; Mozaffarian and Wu, 2018). En relación a los procesos de neuroprotección compuestos como el resveratrol (flavonoide), ha mostrado su eficiencia para disminuir la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF- α reduciendo de esta manera los procesos inflamatorios en el cerebro; así como para reducir la expresión de caspasa 3, la vía JNK y la relación de Bax/Bcl inhibiendo el proceso de apoptosis de las neuronas (Sandoval-Ávila et al., 2019). En la figura 3 se muestran mecanismos de acción y efectos de los compuestos secundarios en diferentes órganos diana.

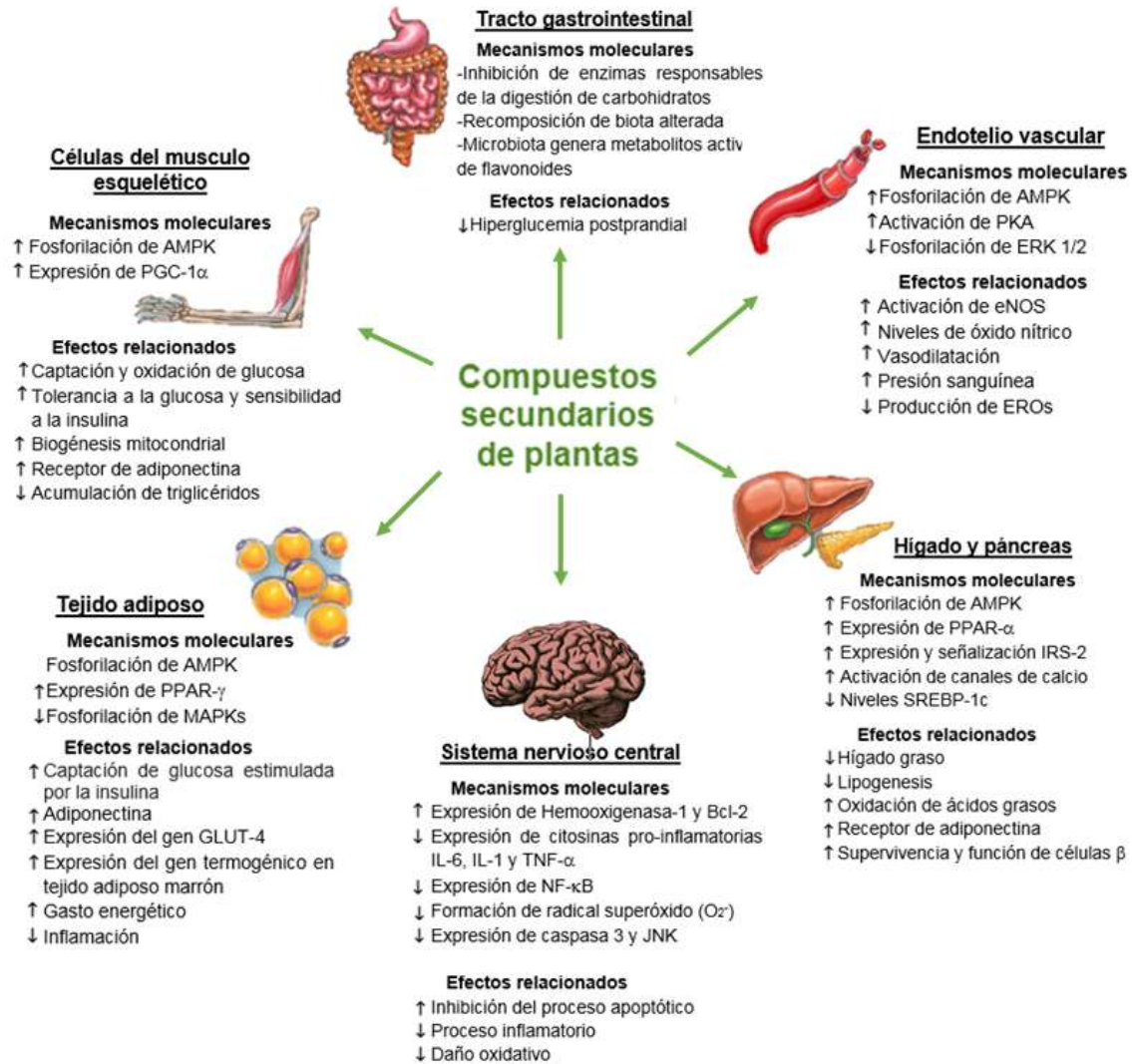


Figura 3. Órganos diana y mecanismos de acción de compuestos secundarios de plantas. AMPK (proteína cinasa activada por AMP), PGC-1 α (proteína 1- α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas), PKA (proteína cinasa A) ERK 1/2 (proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señal extracelular), eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial), PPAR- γ (receptor γ activado por proliferador de peroxisomas), MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos), IRS-2 (sustrato receptor de insulina 2), SREBP-1c (factor 1 de transcripción de unión al elemento regulador de esteroles), GLUT-4 (transportador de glucosa 4), IL-6 (interleucina 6), IL-1 (interleucina 1), TNF- α (factor de necrosis tumoral α), NF κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), JNK(cinasas c-Jun N-terminal)

1.3 Galeana (*Spathodea campanulata*)

También conocido como tulipán africano, es originario de África occidental. Pertenece a la familia Bignoniaceae. Es un árbol que puede medir hasta 25 metros de alto que posee corteza café oscura, hojas compuestas grandes, de 30 a 40 cm, con 9 a 15 hojuelas ovaladas de 3 x 2 cm hasta 16 x 9 cm. El fruto es una cápsula con forma de canoa. Las flores tienen forma de tulipán, pero sesgadas hacia un lado, son de un color rojo-naranja intenso, de alrededor de 10 cm de largo y agrupadas en racimos terminales en las ramas, y florecen en el otoño y en el invierno. Las semillas son finas y de forma aplanada, y se encuentran rodeadas por una ala membranosa. (John, K. F. 1990)

Muchos géneros que pertenecen a la familia Bignoniaceae son conocidos por ser de valor medicinal. Las decocciones de corteza de *Spathodea campanulata*, ha sido utilizadas tradicionalmente por personas del sureste de Nigeria en el manejo de la epilepsia y las convulsiones (Ilodigwe et al., 2010). Es utilizada por los médicos tradicionales africanos para tratar edema, disentería, úlceras, gonorrea, diarrea, inflamación de la uretra, además se ha estudiado su actividad antipalúdica (Makinde et al., 1987). También se usa en la medicina tradicional ruandesa para tratar la diabetes mellitus insulina dependiente y no insulina dependiente (Niyonzima et al., 1999).

En México no se ha reportado algún uso medicinal de *Spathodea campanulata*.

1.4 Alteraciones en el aprendizaje y cambios morfológicos del hipocampo, en presencia de diabetes mellitus.

Gemert y colaboradores realizaron estudios de capacidad cognoscitiva en pacientes diabéticos entre los 40 y los 69 años, un grupo con diagnóstico reciente (n=119) y otro grupo con una evolución de 5 años (n=65), ambos grupos con HbA1c fuera de rango ($6.9 \% \pm 1.1$) y glucosa sanguínea de 157 ± 46 mg/dL en ayuno. La prueba utilizada para evaluar la capacidad cognoscitiva recibe el nombre de Breve Evaluación de la Cognición en la Esquizofrenia (BACS) la cual

incluye pruebas de memoria verbal, memoria de trabajo, fluidez verbal, la atención y la función ejecutiva. Se observaron diferencias entre individuos sin DM y pacientes con DM2, que presentaron deterioro en la memoria verbal (Gemert et al., 2018).

En un grupo de 80 pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2, analizados por medio de resonancia magnética, los volúmenes totales del hipocampo fueron significativamente menores que los del grupo control, principalmente en los subcampos CA1 y subículo. En los pacientes estudiados con DM2 su hemoglobina glicosilada oscilaba en $7.59\% \pm 1.49$. En términos de evaluación cognitiva realizada con la Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA), los pacientes con DM2 tuvieron puntajes significativamente más bajos que los sujetos control, lo que sugiere que su capacidad cognoscitiva se vio afectada. (Zhang et al., 2015).

En otro estudio, se compararon, 61 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con edad aproximada de 65 años presentando HbA1c $>7.5\%$, y un grupo control formado por pacientes sanos cuya HbA1c fue $<6.5\%$: Para evaluar la función cognoscitiva se realizó una Mini Evaluación de Estado Mental (MMSE) y la Evaluación en la Escala de Demencia Hasegawa (HDS-R) que evalúan la orientación, la atención, la memoria, el cálculo, el lenguaje y la capacidad de seguir órdenes escritas y verbales. Como resultado de las resonancias magnéticas en comparación con los controles no diabéticos, los pacientes con diabetes tipo 2, mostraron imágenes de atrofia del hipocampo. En las pruebas de cognición los resultados en pacientes diabéticos fueron significativamente de menos rendimiento en contraste con los individuos sin diabetes mellitus (Hayashi et al., 2011).

Gold y colaboradores analizaron a un grupo de 23 personas diagnosticadas con diabetes mellitus tipo 2 de aproximadamente 10 años de evolución, se denominaron pacientes controlados aquellos que la hemoglobina glicosilada

presentaba cifras de entre 6.9 ± 0.8 , se evaluó el aprendizaje con la prueba verbal de California y la escala de memoria de Wechsler, donde se encontraron deficiencias en la memoria declarativa basada en el hipocampo; este resultado concuerda con la atrofia de tal área cerebral, observada en resonancias magnéticas, todo esto en contraste con los sujetos control sanos (Gold et al., 2007).

El daño en estructuras cerebrales y sus consecuencias sobre funciones cognitivas, atribuibles a la presencia de diabetes mellitus, también ha sido abordado en modelos experimentales en roedores.

En un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina en ratas macho de la cepa Wistar, con hiperglicemia crónica de once semanas de evolución se evaluaron las capacidades cognitivas de las ratas en el laberinto acuático de Morris, así como la expresión de potenciación a largo plazo (LTP) del hipocampo en CA1; ambas pruebas se encontraron alteradas; lo que sugiere un daño a la estructura y a la conectividad sináptica del hipocampo a causa de la hiperglicemia, (Biessels et al., 1996).

En ratas Sprague-Dawley con diabetes tipo 1 inducidas con estreptozotocina tras tres meses de evolución, se observó disminución significativa del número de células piramidales en región CA1 de hipocampo (Zhao et al., 2016). La diabetes inducida por estreptozotocina en ratas provocó cambios en área nuclear y pericarión de neuronas. Se mostraron cambios se observaron en los sectores CA1, CA2, CA3 y giro dentado (Piotrowski et al., 2001).

Stranahan, A. M y colaboradores estudiaron la administración de una dieta alta en calorías (alimento con alto contenido de grasa y glucosa, un 20% de jarabe de maíz alto en fructosa en agua potable), durante 8 meses, en ratas. En estas condiciones el desempeño de las ratas en el laberinto acuático de Morris fue deficiente (latencias de escape y longitud de trayectorias significativamente mayor),

en comparación con el desempeño de ratas control. Asimismo, las mediciones del potenciación a largo plazo (LTP) en las sinapsis colaterales de Schaffer en la región CA1 del hipocampo, mostraron que en las ratas con dieta alta en calorías existe un deterioro de las características de LTP en comparación con las características de LTP en las ratas con una dieta estándar; lo cual sugiere que el consumo excesivo de calorías deteriora los procesos neurales del hipocampo y afecta el aprendizaje y la memoria dependiente de esta estructura cerebral (Stranahan et al., 2008).

En el mismo sentido, se ha mostrado que ratas que consumieron jarabe de maíz con fructuosa al 55% (HFCS-55) durante 30 días a partir del día 30 de edad mostraron deterioro significativo de su eficiencia en pruebas de aprendizaje y memoria en el laberinto Barnes, lo que sugiere que un consumo de azúcares elevado en la dieta durante a edades tempranas puede afectar el aprendizaje y la memoria. A este respecto cabe destacar que HFCS-55 se usa principalmente como edulcorante en refrescos (Hsu et al., 2015). Asimismo, se ha observado deterioro del almacenamiento y recuperación de información a largo plazo, dependiente del funcionamiento del hipocampo, en pruebas en el laberinto acuático de Morris, luego de 19 semanas de consumo *ad libitum* de una dieta con fructosa al 60% (Ross et al., 2009).

Por otra parte, diversos estudios han mostrado los efectos de compuestos y/o metabolitos activos contenidos en plantas, en contra de alteraciones en estructuras cerebrales vulnerables, en modelos experimentales de Diabetes en roedores. Así, se ha descrito que el tratamiento con *Urtica dioica* durante 4 semanas preservó la densidad de astrocitos en los segmentos CA1 y CA3 del cuerno de Ammon del hipocampo, que de otra manera habían resultado reducidos en ratas diabéticas (estreptozotocina), sin tratamiento (Golalipour et al., 2013).

El tratamiento con resveratrol (polifenol) en ratas diabéticas (aloxano), redujo significativamente el índice de neurodegeneración y la activación de astrocitos en

el segmento CA3 del cuerno de Ammon del hipocampo (inmunohistoquímica GFAP y tinción Fluoro-Jade C); sugiriendo que resveratrol podría tener efectos neuroprotectores en contra de daño cerebral inducido por Diabetes (Jing et al., 2013).

II. Justificación

La diabetes y sus complicaciones son parte del grupo de enfermedades crónico degenerativas, que constituyen un problema de salud importante a nivel mundial debido al deterioro de la calidad de vida de los individuos y a las implicaciones sociales y económicas asociadas a esta patología.

Por otra parte se ha observado que la hiperglucemia crónica y las dietas con altas concentraciones de fructosa provoca daño a las neuronas del hipocampo sumando así el deterioro cognitivo a otras complicaciones de la diabetes.

Se ha propuesto que los principios activos hipoglucemiantes que se encuentran contenidos en plantas medicinales pueden ser una alternativa eficaz de los fármacos hipoglucemiantes orales cuya administración a largo plazo forma parte de los esquemas de tratamiento habitual de la diabetes mellitus.

Plantas como Galeana (*Spathodea campanulata*), que pertenecen a la familia Bignoniaceae son conocidas en la medicina tradicional por su eficacia hipoglucemiante.

Dado que el número de personas con diabetes mellitus ha incrementado en los últimos años, es de importancia estudiar una alternativa efectiva con efectos hipoglucemiantes y que además ejerzan un efecto neuroprotector en las regiones del hipocampo.

III. Hipótesis

La administración del extracto acuoso del hojas de Galeana (*Spathodea campanulata*), presenta actividad hipoglucemiante y neuroprotectora en neuronas de CA1 del hipocampo en modelos de ratas con diabetes mellitus tipo 2.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto hipoglucemiante de la administración oral de Galeana (*Spathodea campanulata*) en ratas con diabetes mellitus tipo 2 y evaluar el efecto neuroprotector en neuronas piramidales del CA1 del hipocampo.

4.2 Objetivos Particulares

4.2.1 Cuantificar fenoles, polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante de *Spathodea campanulata*

4.2.2 Evaluar el efecto hipoglucemiante de *Spathodea campanulata* en DM2 en administración aguda y crónica

4.2.3 Analizar el efecto neuroprotector en neuronas piramidales de CA1, posterior a la administración oral de extractos de *Spathodea campanulata*

V. Materiales y métodos

5.1 Obtención de hojas de *Spathodea campanulata* y clasificación taxonómica

Hojas de Galeana (*Spathodea campanulata*) se obtuvieron frente a la Clínica Médica Universitaria de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, con dirección Calzada Ventura Puente #27 Col. Cuauhtémoc, CP. 58020, Morelia, Mich., México.

Se herborizaron y se enviaron al Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para la identificación, clasificación y obtención de número de folio, el cual fue el 1489469 (anexo 1).

5.2 Obtención de extractos de hojas de *Spathodea campanulata*

5.2.1 Obtención del extracto acuoso (EAQSC)

Las hojas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 5%, se pesaron para obtener una concentración de 1mg/ml, se homogenizaron en agua destilada. Se filtraron y centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min, recuperando el sobrenadante, al que se denominó extracto acuoso (Delgado-Vargas et al., 2000).

5.2.2 Obtención de extracto acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC)

Se utilizaron 100 g de hojas desinfectadas y secas, se lavaron en tres ocasiones (una vez por semana) con 1 L de acetona pura. Posteriormente las hojas pasaron a 1 L de etanol 96%, del cual se realizaron tres lavados cada 2 semanas. Ambos solventes polares se emplean para remover con alta eficacia, los compuestos contenidos en la planta y con ello, los componentes activos a los que se les atribuyen diversas funciones biológicas. En acetona pura es posible recuperar compuestos como clorofilas, carotenoides y quinonas, con alcohol 96% se obtienen en su mayoría derivados del benzopirano específicamente antocianinas, flavonoles, flavonas, betalaínas y carotenoides. Estos compuestos fueron concentrados empleando una destilación simple (Delgado-Vargas et al., 2000).

5.3 Cuantificación de metabolitos secundarios

5.3.1 Cuantificación de fenoles totales.

El ensayo de Folin-Ciocalteu (Kim et al., 2003), se utilizó como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760nm. El contenido total de polifenoles de las muestras se calculó como GAE a partir de la curva de calibración de la solución estándar de ácido gálico y se expresó en miligramos equivalentes de GAE por gramo del extracto (Rana et al., 2013).

5.3.2 Cuantificación de polifenoles.

La cuantificación de polifenoles se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (Kim et al., 2003). Una parte de la muestra problema (extracto acuoso), se trató con polivinilpirrolidona (PVPP), que se une específicamente a los polifenoles en un medio ácido. La diferencia de las absorbancias obtenidas a 760 nm entre la parte tratada y la no tratada de cada muestra problema refleja la concentración de polifenoles. Se utilizó una curva patrón de floroglucinol, y las concentraciones obtenidas se reportaron como mg equivalentes de floroglucinol/g extracto (Rivero et al., 2006).

5.3.3 Cuantificación de flavonoides.

La cuantificación de flavonoides se realizó con el método de Dowd, el cual consiste en utilizar tricloruro de aluminio ($AlCl_3$), el cual es capaz de formar compuestos estables con los flavonoides en metanol; estos compuestos se pueden medir espectrofotométricamente a 715 nm y de esta manera determinar la concentración de flavonoides presentes en los extractos. Los valores de absorbancia que se obtuvieron de las muestra problema se interpolaron en una curva patrón de quercetina. El contenido total de flavonoides se expresó en mg

equivalentes de quercetina/g de extracto (Ramamoorthy et al., 2007, Ebrahimzadeh et al., 2010).

5.3.4 Determinación *in vitro* de actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se determinó usando el 1, 1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH). El DPPH es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, la deslocalización del electrón intensifica el color violeta típico del radical. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta cambia a color amarillo. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Se midió la absorbancia a 515 nm hasta que la reacción se estabilizó. El parámetro EC_{50} , refleja la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH, y se expresa en g/g DPPH. También se calculó el tiempo necesario para alcanzar la EC_{50} (TEC_{50}) y la eficiencia antirradical ($AE = 1/EC_{50} \times TEC_{50}$) (Brand-Williams et al., 1995; Sánchez-Moreno et al., 1997; Pérez et al., 2007).

5.4 Modelo animal

Se emplearon ratas macho Wistar a partir de 100 g peso. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), con suministro de alimento y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 2011 del Consejo Nacional de Investigación, Washington, DC. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

5.4.1 Inducción de diabetes experimental

La inducción de diabetes tipo 2 se realizó con la administración oral de fructosa al 60% *ad libitum*, esta administración se realizó previo al destete y los animales se consideraron diabéticos, si sus niveles de glucosa sanguínea se encontraban por arriba de 100 mg/dL a las 4 semanas posteriores a la administración de fructosa y presentaban un peso corporal superior a los 100g (Dupas et al., 2016). La rata alimentada con fructosa es un modelo animal que muestra numerosas características de síndrome metabólico, este modelo animal se ha utilizado para estudiar la relación entre la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria, hiperglucemia, así como el desarrollo de hipertensión (Delbosc et al., 2005; Tran et al., 2009).

Altas concentraciones de fructosa, reducen la disponibilidad de ATP, lo que conlleva a la excesiva producción de ácido úrico e inhibición del óxido nítrico sintasa ambos mecanismos contribuyen al desarrollo de hipertensión. También activa la desacetilación de SIRT1 lo cual contribuye a la gluconeogénesis y por lo tanto al aumento de glucosa sanguínea circulante. La fructosa-1P regula al alza la expresión de PGC-1 β promoviendo la lipogénesis a través de la activación de SREBP1c. Además la fructosa proporciona cadenas de carbono para la síntesis de triglicéridos, diacilglicéridos y colesterol que contribuyen a la hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina. Finalmente, las ROS generadas por la fructosilación aumentan el daño oxidativo en el interior de las células, lo que provoca daño en el ADN y un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias (Pereira et al., 2017)

5.4.2 Administración aguda y crónica de extractos/fármacos

Los extractos fueron administrados vía oral con una cánula de alimentación animal de 16 G x 3 y curvada de 3 mm (NOM-062-ZOO-1999). Se probaron de forma aguda con base en las guías de toxicidad en animales, las siguientes dosis de EAQSC: 5, 25, 50, 150, 300, 2000 y 5000 mg/kg. Para el EASC se probaron las dosis: 2, 4 y 8 mg/Kg y para el EOHSC 4 mg/kg (OECD 420, 2001). Cada una de

las concentraciones tuvo como finalidad establecer la dosis óptima hipoglucemiante y observar la probable presencia de efectos secundarios de dichos extractos.

Los animales fueron aleatorizados en los siguientes grupos experimentales (n=6):

Grupo I: Sanos + EAQSC, EASC o EOHSC

Grupo II: Diabéticos + Solución salina 9%

Grupo III: Diabéticos + Metformina 100 mg/kg

Grupo IV: Diabéticos + EAQSC, EASC o EOHSC

De forma crónica se administró el EAQSC, se formaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo I: Sanos + EAQSC

Grupo II: Diabéticos + EAQSC 300 mg/kg

Grupo III: Diabéticos + Metformina 100 mg/kg

5.4.3 Administración aguda

5.4.3.1 Métodos para evaluar la capacidad hipoglucemiante de plantas

5.4.3.1.1 Curva de tolerancia a la glucosa

Las propiedades hipoglucemiantes de los extractos de hojas de *Spathodea campanulata* fueron evaluadas con curvas de tolerancia a la glucosa. En el campo clínico dicho ensayo se emplean para el diagnóstico de diabetes, el cual tiene una duración de 3 horas evaluando la capacidad metabólica del paciente sobre la glucosa (American Diabetes Association, 2014^[b]). En el estudio de plantas medicinales la curva de tolerancia a la glucosa, se utiliza para determinar la capacidad hipoglucemiante de dichas plantas, a diferencia del empleo en humanos, el estudio en animales tiene duración de 6 horas, esto debido a la tasa de absorción de compuestos orgánicos de plantas en el sistema biológico (Manach et al., 2005; Hanhineva et al., 2010).

Los animales se mantuvieron en ayuno 4 horas previo a los ensayos (Dupas et al., 2016). Se inició con la toma de glucosa basal, se administró el tratamiento establecido (solución salina 9%, metformina 100 mg/kg o extractos de hojas de

Spathodea campanulata en sus diferentes concentraciones), por vía oral a cada grupo y media hora después se administró una carga de glucosa oral de 1.5 g/kg, posteriormente se tomaron mediciones de glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Chek Performa, Roche) a los 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos, empleando un (Fenton-Navarro et al., 2018).

5.4.3.1.2 Curva de glucosa en ayuno

En el estudio de plantas medicinales la curva de glucosa en ayuno se emplea para determinar efectos hipoglucemiantes y por otra parte para observar su posible efecto en la liberación de glucosa hepática (glucogenólisis), dado que uno de los factores que modifican la concentración de glucosa sanguínea en presencia de DM, es el ayuno (Alberto et al., 2004; Figueroa-García et al., 2016). Los animales se mantuvieron en ayuno 4 horas previo a los ensayos (Dupas et al., 2016). Se inició con la toma de glucosa basal y se administró por vía oral, solución salina 0.9%, metformina 100 mg/kg o extractos de hojas de *Spathodea campanulata* en sus diferentes concentraciones, posteriormente se tomaron mediciones de glucosa sanguínea a los 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 minutos, empleando un glucómetro Accu-Chek Performa de Roche (Fenton-Navarro et al., 2018).

5.4.4 Administración crónica

Se realizó la administración crónica, del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* 300mg/kg cada 24 horas, vía oral, durante quince semanas. Al inicio del tratamiento crónico fueron sacrificados dos grupos de animales en tiempo cero: sanos y diabéticos (n=6 por grupo).

5.4.4.1 Peso de los animales y glucosa sanguínea

Durante la administración crónica se monitoreo una vez por semana el peso de los animales (balanza digital SF-400), con la finalidad de observar si la cronicidad de la administración alteraba la salud del animal en relación al apetito, y la glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Chek Performa, Roche), para evaluar el efecto hipoglucemiante a largo plazo.

5.4.4.2 Hemoglobina glicosilada

La hemoglobina glicosilada es considerada como un marcador de glucemia crónica (3 meses), se relaciona directamente con el riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares y macrovasculares características de DM. (Pereira-Despaigne et al., 2015).

La medición de la hemoglobina glicosilada se realizó a los grupos en tiempo inicial de la administración crónica (n=6 por grupo), en el grupo I de animales sanos y el grupo II de diabéticos tipo 2. También se realizó al final de la administración crónica en los grupos, sanos tratados con EAQSC, diabéticos tratados con EAQSC 300 mg/kg y diabéticos tratados con metformina 100 mg/kg. Se empleó el kit comercial Bio-Glico del Grupo Mexlab (código: 4001301), el cual emplea una resina de intercambio iónico de débil unión para la separación de la glicohemoglobina de la hemoglobina no glicosilada.

La glicohemoglobina se forma continuamente por la adición de glucosa a la N terminal de la cadena β de la hemoglobina. Este proceso refleja el promedio de exposición de la glucosa a la hemoglobina, sobre un período extenso de tiempo (tres meses). La glicohemoglobina ha sido definida como la “fracción rápida” de la hemoglobina (Hb-A1a, A1b, A1c) la cual fluye primero durante la cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico. La hemoglobina no glicosilada, la cual constituye el resto de la hemoglobina, ha sido designada HbAo. (Larsen et al., 1990; Álvarez Seijas et al., 2009).

5.4.4.3 Evaluación de los parámetros de orina

La identificación de variaciones en los componentes de la orina se realizó cada tres semanas con manipulación del animal, que defeca y orina como respuesta al estrés (NOM-062-ZOO-1999). Se emplearon tiras reactivas Combur 10 Test de Roche, las cuales miden 10 parámetros en orina: gravedad específica (densidad), valor de pH, leucocitos, nitritos, proteína, glucosa, cetonas, urobilinógeno,

bilirrubina y sangre (eritrocitos y/o hemoglobina). En la tabla 1 se muestra la metodología de cada prueba así como su interpretación clínica.

Tabla 1. Parámetros de orina y sus características

Parámetro	Principio de la prueba	Indicador fisiológico
Densidad	El ensayo detecta la concentración de iones en la orina. En presencia de cationes, un formador de complejos libera a los protones que producen un cambio cromático en la solución indicadora azul de bromotimol, el cual cambia del azul al amarillo pasando por el azul verdoso.	Menos de 1.010, significa que la orina está muy diluida y la concentración de partículas es muy baja, sucede cuando el riñón elimina más cantidad de agua de lo normal. Más de 1.020, la orina tiene muchas sustancias concentradas, suele ocurrir en situaciones de deshidratación, cuando el riñón reabsorbe más agua y la orina aparece así más concentrada.
pH	El ensayo contiene, indicador rojo de metilo, fenolftaleína y azul de bromotimol y reacciona específicamente con los iones H ⁺ .	El pH de la orina fresca de personas sanas se sitúa normalmente entre 5 y 7. pH menor de 4,5: indica que hay un exceso de sustancias ácidas en el organismo. pH mayor de 7,5: sucede cuando los riñones no son

		capaces de eliminar las sustancias alcalinas de la sangre, de forma que se acumulan y producen alteraciones metabólicas.
Leucocitos	Se detectan por acción de la esterasa presente en los leucocitos granulados, que cataliza la hidrólisis de un éster de ácido indoxilcarbónico a indoxilo. El indoxilo formado reacciona con una sal de diazonio produciendo un colorante púrpura.	Es un signo de inflamación, causada generalmente por una infección de las vías urinarias.
Nitritos	Se basa en el principio del ensayo de Griess. Basada en la reacción de ácido p-arsanílico y nitrito, derivado del nitrato de la dieta en presencia de bacterias de la orina, para formar un compuesto de diazonio. Este compuesto reacciona con N-(1-naftil) etilendiamina en un medio ácido. El color resultante es rosa.	La reacción revela la existencia en orina de bacterias formadoras de nitritos, tiñendo la zona reactiva de color rosa.
Proteína	Basada en el cambio de color del indicador, azul de tetrabromofenol, en presencia de proteínas. Una reacción positiva está indicada por un cambio de color del amarillo verdoso al verde, y luego al verde intenso.	La presencia de pequeñas cantidades de proteína en la orina puede ser un signo temprano de daño renal.

Glucosa	Se basa en la reacción específica de la glucosaoxidasa/peroxidasa (método GOD/POD). La glucosaoxidasa cataliza la oxidación de la glucosa dando ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Luego, la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con ioduro de potasio, formándose productos coloreados que van desde celeste verdoso, pasando por marrón verdoso intermedio, a marrón.	La cantidad de glucosa en sangre es tan elevada (>180 mg/dL aprox.) que el riñón no puede reabsorberla y la elimina.
Cetonas	Se basa en la reacción de ácido acetoacético de la orina con nitroprusiato. El color resultante va desde tostado, cuando no hay reacción, a distintos tonos de púrpura para reacciones positivas.	Se forman cuando el organismo descompone las grasas. Pueden aparecer en la orina como consecuencia de la inanición, de una diabetes mellitus no controlada y en ocasiones después de beber cantidades considerables de alcohol.
Urobilinógeno	Se basa en la unión de la bilirrubina con la sal de diazonio del 2,4-diclorofenilo en un medio fuertemente ácido. El color cambia de tostado suave a tostado intenso.	Su presencia indica un problema en el funcionamiento del hígado y/o vías biliares.
Bilirrubina	Se basa en la unión de la bilirrubina con la sal de diazonio del 2,4-	Su presencia indica un problema en el

	diclorofenilo en un medio fuertemente ácido. El color de tostado suave a tostado intenso.	funcionamiento del hígado y/o vías biliares.
Sangre (eritrocitos/hemoglobina)	Esta prueba está basada en la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina, la cual cataliza la reacción de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con hidróperóxido orgánico tamponado. El color resultante varía desde verdoso-amarillento, pasando por verde azulado, hasta azul oscuro.	Señala daño en el riñón o en las vías urinarias. La presencia de eritrocitos totales indica daños en las vías inferiores. En cambio la presencia de hemoglobina indica un daño en el filtrado glomerular y por lo tanto la ruptura del hematíe.

(Shah, A.P., 2019; Wians, F.H., 2019; Combur¹⁰Test)

5.5 Procesamiento histológico de cerebros

5.5.1 Conteo de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo

Se realizaron cortes histológicos de los animales pertenecientes a los grupos controles sanos y diabéticos en tiempo cero, así como los administrados con metformina y el extracto acuoso al final de las quince semanas de tratamiento.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico 150 mg/kg (NOM 062-ZOO-1999) y fueron perfundidos por vía intracardiaca con solución salina 0.9% seguida de una solución de formaldehído al 4%, para la extracción de cerebros y el posterior procesamiento histológico.

Los cerebros permanecieron en formaldehido 4% hasta su procesamiento, posteriormente se realizaron cortes coronales 4mm, para ello se utilizó una matriz de acrílico para cortes coronales de cerebro de rata (Stoelting mod. 51384), dichos cortes se deshidrataron y se fijaron en parafina, se empleó un microtomo Mod. HM 325, para obtener series de cortes coronales de 7 µm de espesor, del hipocampo

dorsal localizado entre -2.52 mm y -4.56 mm a partir de bregma, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson, 2009), uno de cada cinco cortes coronales se tiñeron con violeta de cresilo 0.5% a pH 3.9, dichos cortes se observaron en microscopio óptico a 400x, y se realizó el conteo de neuronas piramidales (neuronas con morfología normal, integridad de la membrana y nucléolo claramente visible) en una extensión lineal de 600 μ m del estrato piramidal del segmento CA1 del Cuerno de Ammon del hipocampo.

5.6 Análisis estadístico

Se realizó por medio de estadística descriptiva donde se utilizaron las medidas de tendencia central y dispersión de valores (media \pm Desviación Estándar). Asimismo, en caso de ser normal la distribución de datos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se realizó un análisis post-hoc con la prueba de Tukey.

VI. Resultados

6.1 Cuantificación de fenoles totales, polifenoles y flavonoides

La figura 4 muestra la curva patrón de ácido gálico donde se interpolaron los datos de absorbancia obtenidos de los diferentes extractos (EAQSC, EASC y EOHSC) para conocer la concentración de fenoles. En la tabla 2 se muestra la concentración de fenoles totales, expresado en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto. Puede observarse, que el EAQSC y EOHSC presentan la mayor cantidad de fenoles en comparación con el EASC.

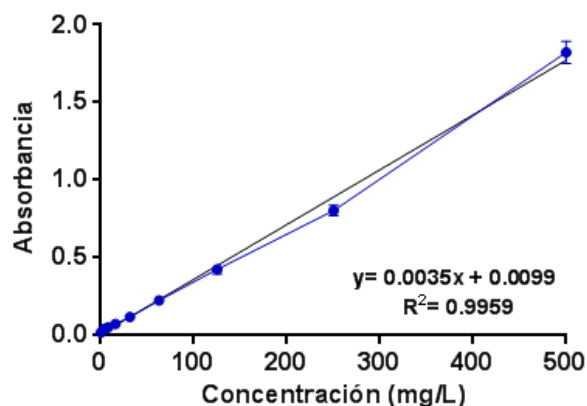


Figura 4. Curva patrón de ácido gálico. Los datos representan la media \pm DE (n=6).

Tabla 2. Contenido de fenoles presentes en extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*.

Extracto	Fenoles mg GAE/g extracto
EAQSC	1373.23 \pm 52.91 a
EASC	270.3 \pm 2.09 b
EOHSC	2100.0 \pm 2.71 c

Los datos se expresan como media \pm DE (n=6), mg GAE/g extracto = miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto. Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos ($P \leq 0.0001$). Extracto acuoso (EAQSC), acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC) de hojas de *Spathodea campanulata*.

En la cuantificación de polifenoles se empleó una curva patrón de floroglucinol la cual se muestra en la figura 5. El contenido de polifenoles de los diferentes extractos se muestra en la tabla 3. Puede observarse que el EASC presenta la mayor cantidad de polifenoles respecto a al EAQSC y EOHSC.

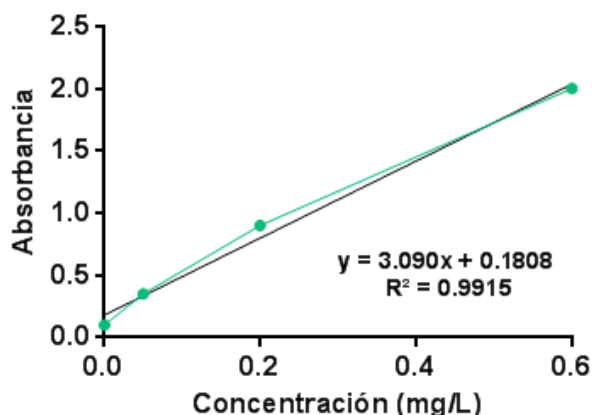


Figura 5. Curva patrón de floroglucinol. Los datos representan la media \pm DE (n=6).

Tabla 3. Contenido de polifenoles presentes en extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*.

Extracto	Polifenoles mg EF/g extracto
EAQSC	24.65 \pm 11.05 ^a
EASC	484.63 \pm 15.4 ^b
EOHSC	73.02 \pm 2.51 ^c

Los datos se expresan como media \pm DE (n=6), mg EF/g extracto = miligramos equivalentes de floroglucinol por gramo de extracto. Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos ($P \leq 0.0001$). Extracto acuoso (EAQSC), acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC) de hojas de *Spathodea campanulata*.

La curva patrón de quercetina fue empleada en la cuantificación de flavonoides la cual se muestra en la figura 6. En la tabla 4, se muestran las concentraciones de los EAQSC, EASC y EOHSC respectivamente expresados en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto. Puede observarse que el EOHSC presenta la mayor concentración de flavonoides en comparación con los extractos acuoso y acetónico.

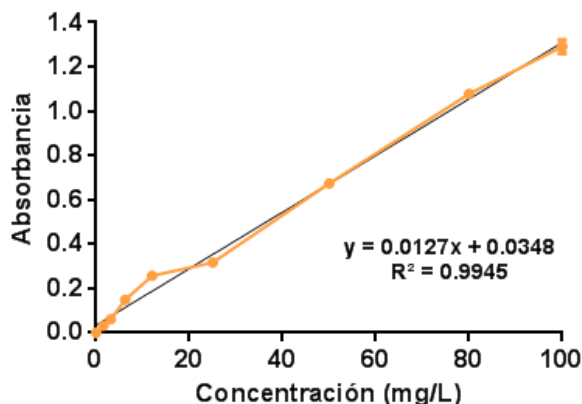


Figura 6. Curva patrón de quercetina. Los datos representan la media \pm DE (n=6).

Tabla 4. Contenido de flavonoides presentes en extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*.

Extracto	Flavonoides mg QRE/g extracto
EAQSC	190.41 \pm 0.39 a
EASC	493.23 \pm 9.55 b
EOHSC	1397.39 \pm 30.18 c

Los datos representan la media \pm DE (n=6). mg QRE/g extracto = miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto. Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos ($P \leq 0.0001$). Extracto acuoso (EAQSC), acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC) de hojas de *Spathodea campanulata*.

6.2 Determinación de actividad antioxidante *in vitro*.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de EC₅₀ y TEC₅₀, y la eficiencia antirradical obtenida por cálculo con los dos parámetros anteriores. Además se muestran los valores obtenidos del extracto acuoso, acetónico y alcohólico así como los controles de ácido ascórbico y ácido gálico. Al compararse los extractos con el control de ácido ascórbico (considerado un excelente antioxidante) se observan resultados similares con los extractos acuoso y acetónico, el extracto alcohólico tiene resultados similares al control de ácido gálico (considerado de mediana actividad antioxidante). En la figura 7, se ilustra el porcentaje de inhibición de DPPH que realizó el ácido ascórbico como control y los diferentes extractos de hojas de *Spathodea campanulata*. Se observa con el control de ácido ascórbico la inhibición al 100% de DPPH en cuestión de pocos minutos. Los tres extractos presentan un comportamiento similar en el porcentaje de inhibición y en el tiempo de acción, en comparación con el control, presentan inhibición del 70% del total de DPPH.

Tabla 5. Actividad antioxidante *in vitro* de extractos de hojas de *Spathodea campanulata*.

Muestra	EC ₅₀ g hoja/Kg DPPH	TEC ₅₀ minutos	EA x10 ⁻³
Control Ácido ascórbico	78.14 ± 4.5 a	1.37 ± 0.25 a	9.304 a
Control Ácido gálico	31.64 ± 0.18 b	14.00 ± 1.12 b	2.25 b
EAQSC	70.86 ± 9.67 a	0.18 ± 0.044 c	7.84 a
EASC	83.47 ± 0.062 a	1.67 ± 0.408 a	7.17 a
EOHSC	41.13 ± 0.026 b	12.14 ± 6.36 b	2.00 b

Los datos representan la media ± DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos (P ≤ 0.0001). EC₅₀= cantidad necesaria de antioxidante para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH; TEC₅₀= tiempo necesario para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH; EA= Eficiencia antirradical; DPPH= 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Extracto acuoso (EAQSC), acetónico (EASC) y alcohólico (EOHSC) de hojas de *Spathodea campanulata*.

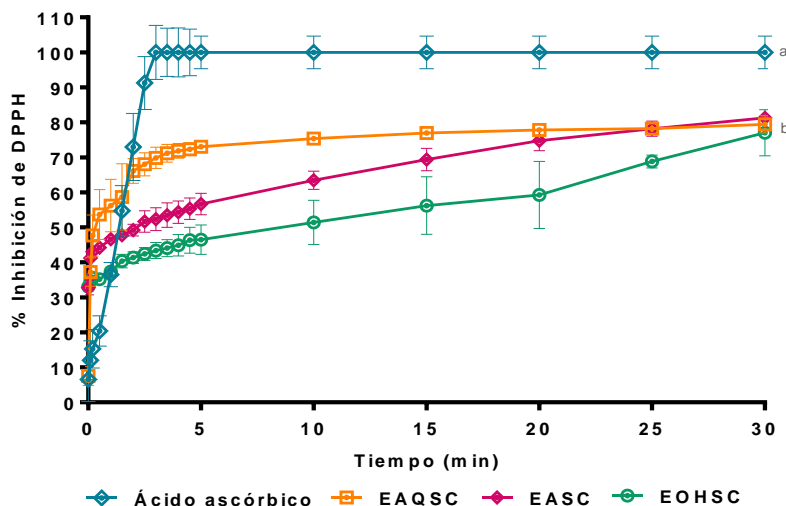


Figura 7. Porcentaje de inhibición de DPPH por ácido ascórbico y extractos de hojas de *Spathodea campanulata*. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos, donde EAQSC, EASC y EOHSC no presentan diferencias significativas entre sí, y son diferentes a ácido ascórbico ($P \leq 0.0001$).

6.3 Modelo experimental de diabetes

En la tabla 6 se muestran los parámetros (presencia y/o concentración de componentes) en sangre y de orina, en los cuales se basó el establecimiento de diabetes tipo 2 en los animales de experimentación. La alteración de dichos parámetros indica la inducción adecuada del modelo de diabetes tipo 2 con fructosa al 60%. Además los valores de la densidad y el pH de la orina indican que, a pesar de la elevada concentración de fructosa, los animales no se encontraban deshidratados y que la alteración de los tres parámetros (proteínas, cetonas y hemoglobina), proceden del deterioro renal característico de diabetes (Dupas et al., 2016; Shah et al., 2019; Wians et al., 2019). En la figura 8, se muestran los resultados de la determinación de glucosa sanguínea, en ayuno, en el curso del desarrollo del modelo de diabetes tipo 2 en los animales de experimentación. Puede observarse un incremento significativo de las concentraciones glucosa sanguínea a partir de la segunda semana de

administración de fructosa al 60%, manteniéndose dicho incremento semanas posteriores indicando el correcto establecimiento del modelo experimental.

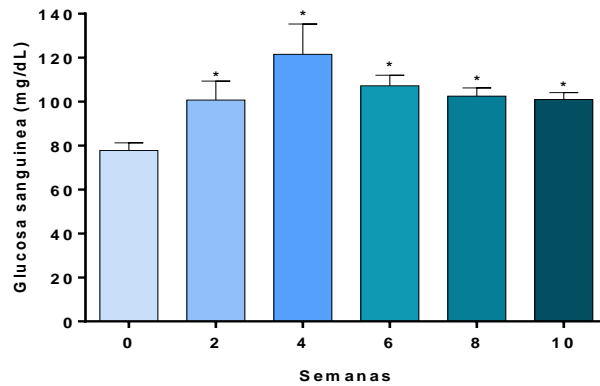


Figura 8. Glucosa sanguínea en la inducción del modelo experimental de diabetes tipo 2. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Los * representan las diferencias significativas con respecto al tiempo cero (semana 0) ($P \leq 0.05$).

Tabla 6. Parámetros de sangre y de orina en la inducción por fructosa 60% al modelo de diabetes tipo 2.

	Sanos	Diabetes mellitus 2
		Fructosa 60% 4 semanas
Parámetros en sangre		
Glucosa sanguínea (mg/dL)	80	>100
Hemoglobina glicosilada (%)	5 a 6	>6.5
Parámetros en orina		
Densidad	1.010-1.020	1.010-1.020
pH	5 – 7	5 – 7
Leucocitos (Leuco/ μ L)	Negativo	Negativo
Nitritos	Negativo	Negativo
Proteínas (mg/dL)	Negativo	30 -100
Glucosa (mg/dL)	Negativo	Negativa
Cetonas (mg/dL)	Negativo	40 – 80
Urobilinógeno (UE)	Normal	Normal
Bilirrubinas	Negativo	Negativo
Eritrocitos (Ery/ μ L)	Negativo	Negativo
Hemoglobina (Ery/ μ L)	Negativo	10

6.4 Evaluación de la capacidad hipoglucemiante del extracto acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*

6.4.1 Curvas de tolerancia a la glucosa

En la figura 9 se presentan los resultados correspondientes a los efectos hipoglucemiantes de diferentes dosis de EAQSC en animales sanos. Puede observarse el grupo tratado con solución salina no presenta reducción de la glucosa sanguínea, el grupo tratado con metformina y con cada una de las dosis evaluadas, presento reducción de la glucemia, mostrando que los extractos no generan una liberación de glucosa hepática.

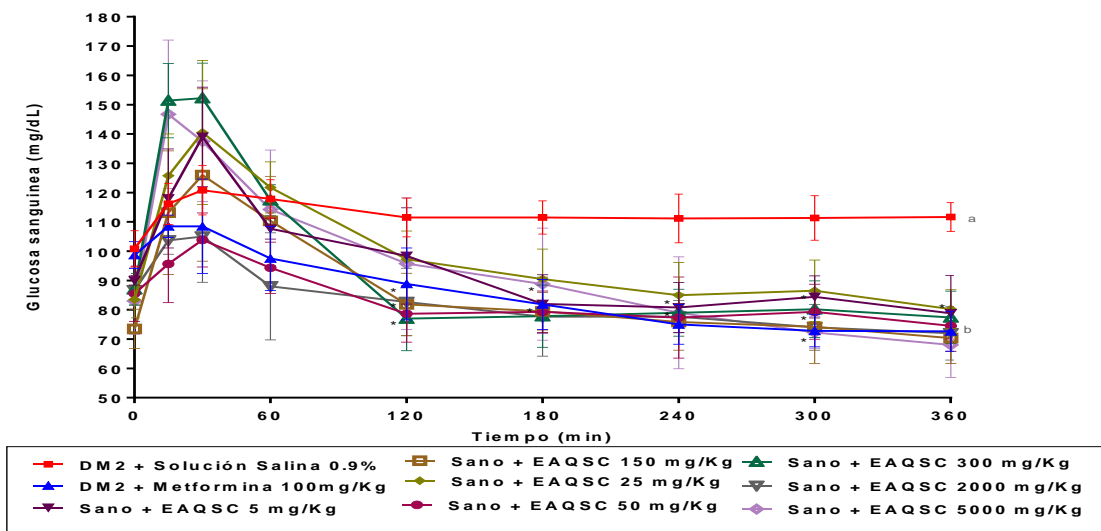


Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* en ratas sanas. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

Tabla 7. Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*

	Reducción (%) [] inicial y final glucosa	Reducción (%) En relación a metformina	Área bajo la curva (%)
Solución salina 0.9%	0 ± 2.92 _a	0 ± 2.92 _a	100
Metformina 100mg/Kg	26.36 ± 5.9 _b	100 ± 5.9 _b	75.08
EAQSC mg/Kg			
5	10.57 ± 8.3 _c	40.09 ± 6.12 _c	84.52
25	7.84 ± 1.27 _c	29.74 ± 4.27 _c	88.93
50	8.09 ± 4.60 _c	30.72 ± 10.22 _c	83.27
150	14.03 ± 2.98 _c	53.23 ± 5.15 _c	87.29
300	22.66 ± 7.51 _b	86.00 ± 4.38 _b	81.29
2000	6.15 ± 5.05 _a	23.36 ± 14.84 _c	90.27
5000	6.41 ± 3.30 _a	24.32 ± 12.53 _c	89.33

Las letras minúsculas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0.05$), donde ($a \neq b$ y c), ($b \neq a$ y c) y ($c \neq a$ y b); ($n=6$) EAQSC = Extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*.

En la tabla 7 se muestran los resultados correspondientes a los efectos de diferentes dosis de EAQSC, en animales diabéticos. Se observa que la dosis óptima hipoglucemiante resultó ser de 300 mg/Kg reduciendo un 22.66% en base de la concentración inicial y final de glucosa sanguínea y en base a metformina (100% reducción) presentó una reducción del 86.00%

En la figura 10 se muestran curvas de tolerancia a la glucosa obtenidas en animales diabéticos, en condiciones de control y con la administración de diferentes dosis de EAQSC y en la figura 11 se ilustran los mismos resultados normalizados. Se observa, el grupo control negativo muestra un incremento de la glucemia durante toda la prueba, en cambio el control positivo tratado con metformina presenta reducción de la glucosa desde lo primero 120 minutos de la prueba, cada una de las dosis evaluadas presentó reducción de la concentración de glucosa en diferentes porcentajes, observando que la dosis de 300 mg/Kg

presenta similitud con el grupo control positivo, siendo la mejor dosis hipoglucemiante del extracto acuoso.

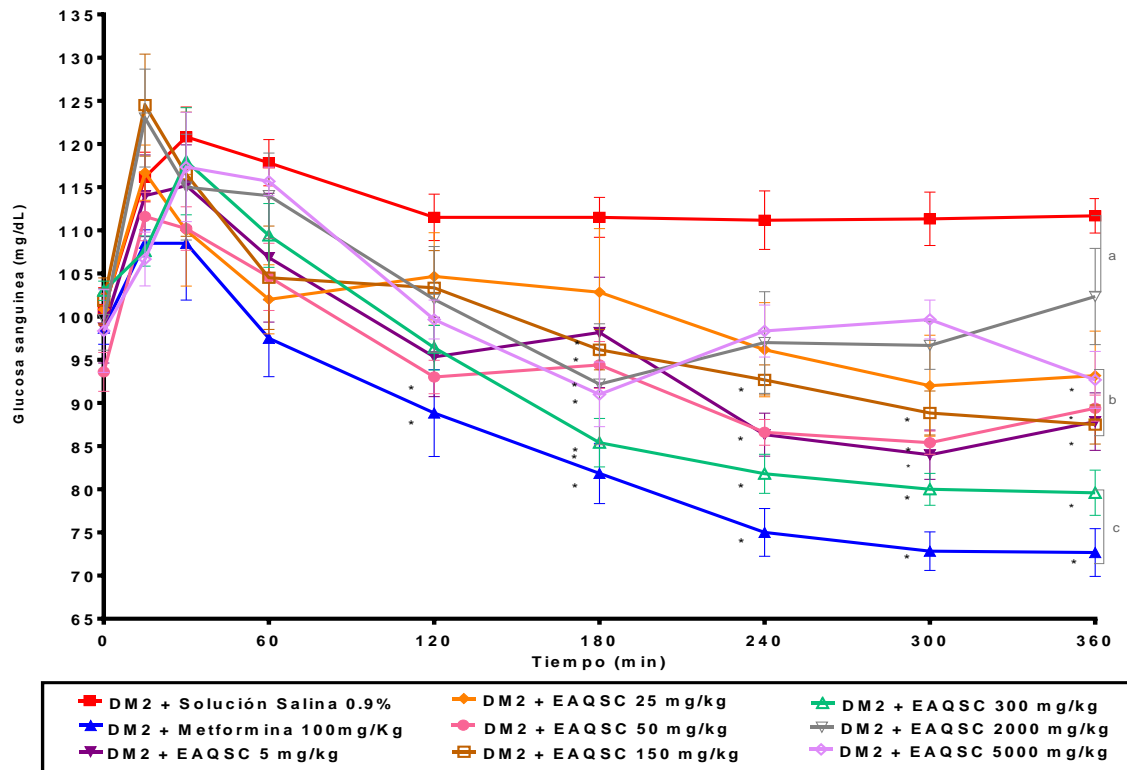


Figura 10. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* en modelo de diabetes tipo 2. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

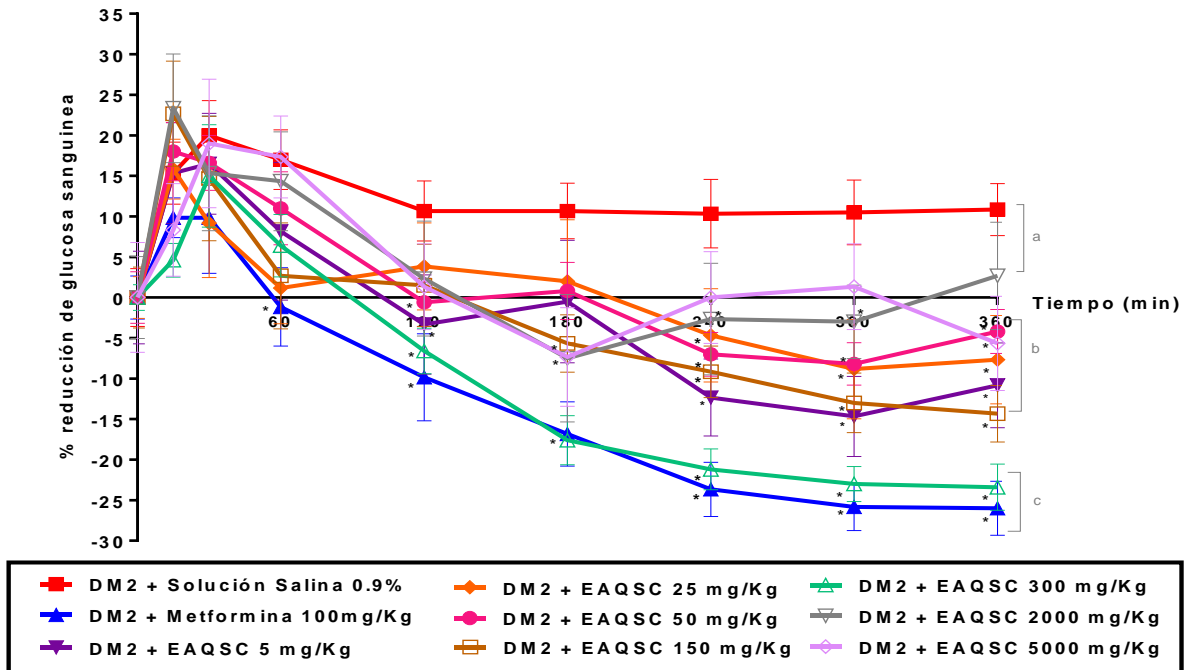


Figura 11. Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea en animales diabéticos administrados con el extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

En la figura 12 se presentan los resultados correspondientes a los efectos hipoglucemiantes de diferentes dosis de EASC en animales sanos. Se observa el grupo tratado con solución salina no presenta reducción de la glucosa sanguínea, el grupo tratado con metformina y con cada una de las dosis evaluadas, presento reducción de la glucemia, mostrando que los extractos no generan una liberación de glucosa hepática.

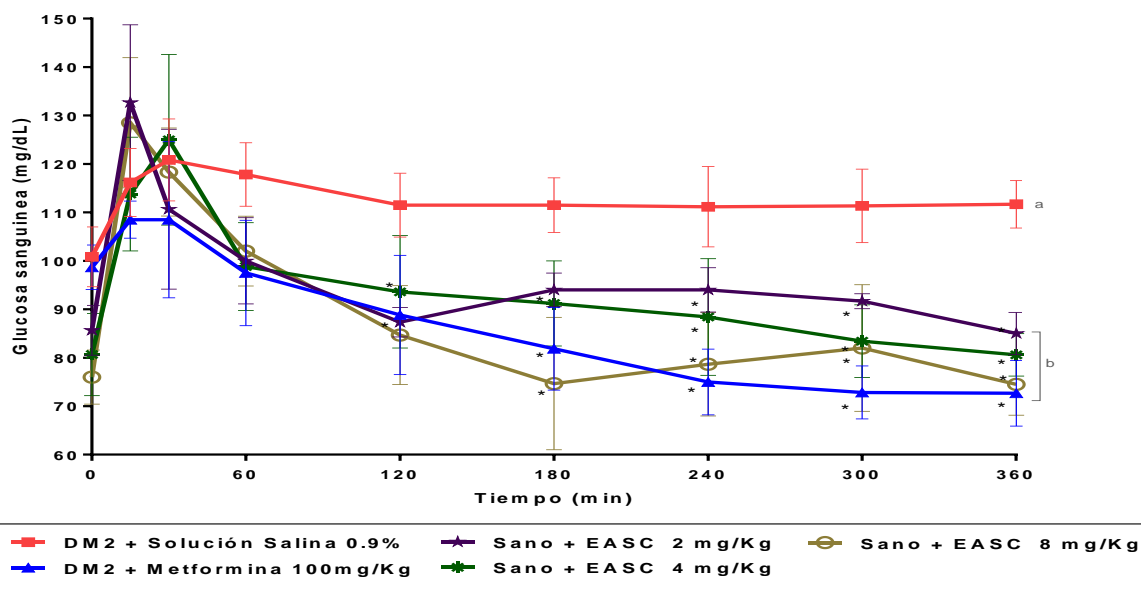


Figura 12. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acetónico de hojas de *Spathodea campanulata* en animales sanos. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

Tabla 8. Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa del extracto acetónico de hojas de *Spathodea campanulata*.

	Reducción (%) [] inicial y final glucosa	Reducción (%) En relación a metformina	Área bajo la curva (%)
Solución salina 0.9%	0 \pm 2.92 a	0 \pm 2.92 a	100
Metformina 100mg/Kg	26.36 \pm 5.9 b	100 \pm 5.9 b	75.08
EASC mg/Kg			
2	2.28 \pm 3.96 c	8.64 \pm 18.40 c	88.49
4	16.63 \pm 5.58 d	63.08 \pm 21.19 d	84.90
8	7.40 \pm 6.41 e	28.07 \pm 24.33 e	93.48

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre dosis ($P \leq 0.05$), donde ($a \neq b$ y c), ($b \neq a$ y c) y ($c \neq a$ y b); (n=6). EASC = Extracto acetónico de hojas de *Spathodea campanulata*.

En la tabla 8 se muestran los resultados, incluyendo porcentajes de reducción de glucosa y área bajo la curva en las curvas de tolerancia a la glucosa, en condiciones de control, así como los efectos de la administración de metformina y de diferentes dosis de EASC, en animales diabéticos y en la figura 10 se ilustran los mismos resultados normalizados. Puede observarse que la dosis 4mg/Kg mostro el mejor efecto hipoglucemiante. En la figura 13 se muestra el gráfico correspondiente a la curva de tolerancia a la glucosa, con las dosis de 2, 4 y 8 mg/Kg de EASC en animales diabéticos tipo 2 y en la figura 14 se ilustran los mismos resultados normalizados, se observa el grupo control negativo muestra un incremento de la glucemia durante toda la prueba, en cambio el control positivo tratado con metformina presenta reducción de la glucosa desde lo primero 120 minutos de la prueba, cada una de las dosis evaluadas presento reducción de la concentración de glucosa en diferentes porcentajes, observando que la dosis de 4mg mg/Kg presenta similitud con el grupo control positivo, siendo la mejor dosis hipoglucemiante del extracto acetónico.

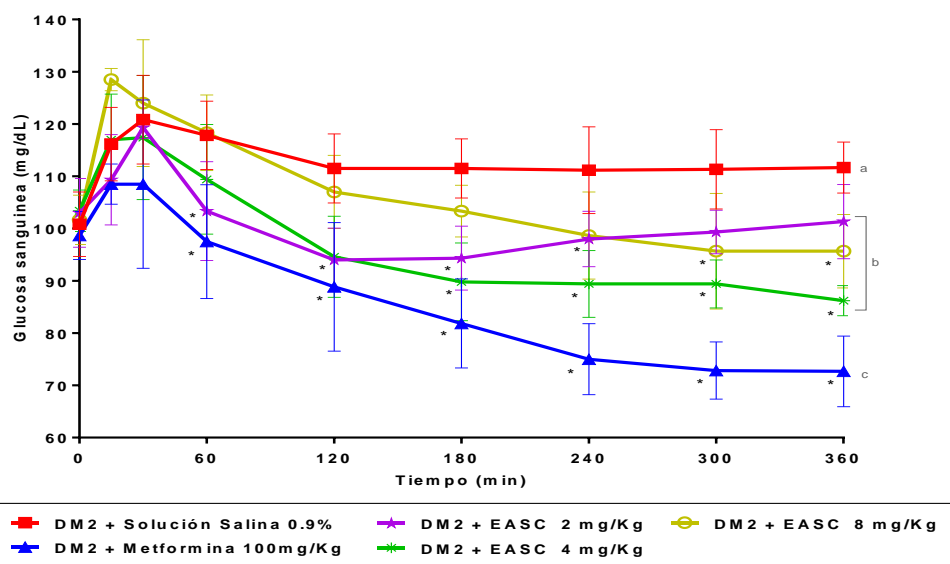


Figura 13. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto acetónico de hojas de *Spathodea campanulata* en modelo de diabetes tipo 2. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

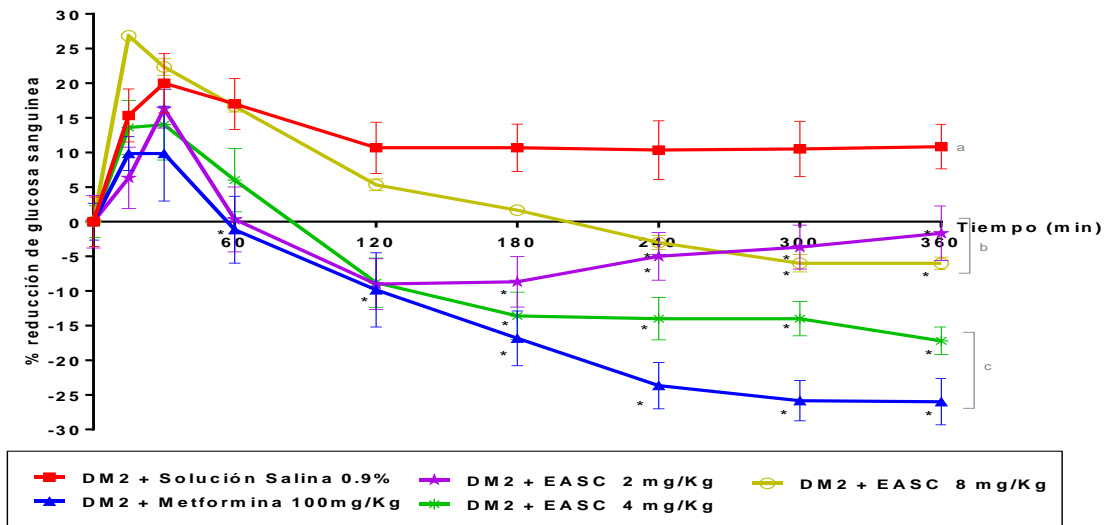


Figura 14. Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea con el extracto acetónico de hojas de *Spathodea campanulata*. Los datos representan la media \pm DE (ensayos n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

En la figura 15 se presentan los resultados correspondientes a los efectos hipoglucemiantes de diferentes dosis de EOHSC en animales sanos. Puede observarse el grupo tratado con solución salina no presenta reducción de la glucosa sanguínea, el grupo tratado con metformina y con cada una de las dosis evaluadas, presento reducción de la glucemia, mostrando que los extractos no generan una liberación de glucosa hepática.

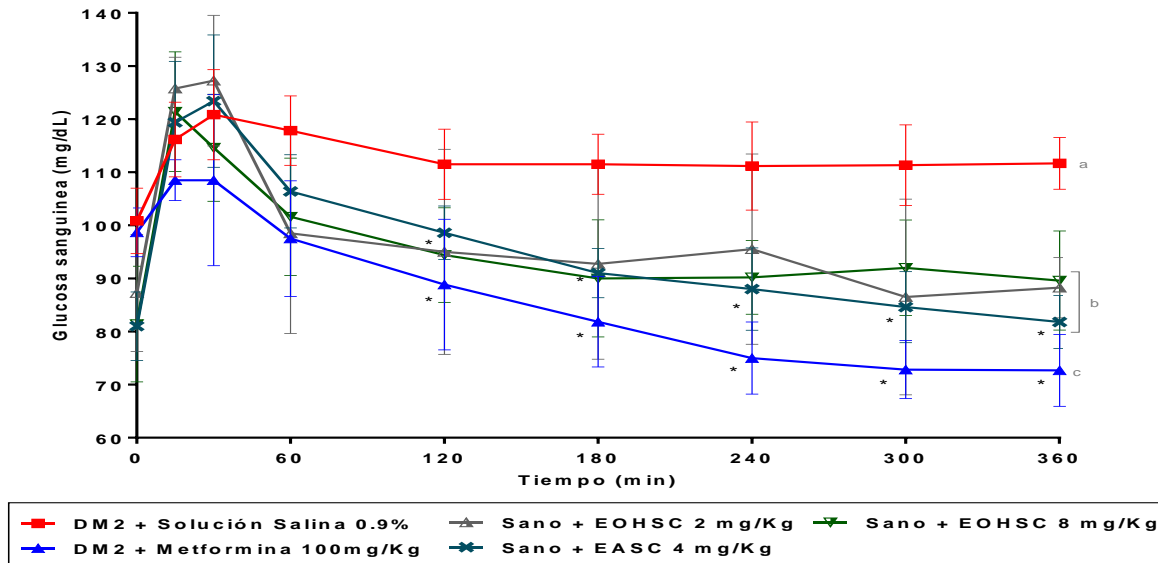


Figura 15. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata* en animales sanos. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

En la tabla 9 se muestran los resultados, incluyendo porcentajes de reducción de glucosa y área bajo la curva en las curvas de tolerancia a la glucosa, en condiciones de control, así como los efectos de la administración de metformina y de diferentes dosis de EOHSC, en animales diabéticos. Puede observarse que la dosis 4mg/Kg mostro el mejor efecto hipoglucemiante.

Tabla 9. Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa del extracto alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*.

	Reducción (%) [] inicial y final glucosa	Reducción (%) En relación a metformina	Área bajo la curva (%)
Solución salina 0.9%	0 ± 2.92 a	0 ± 2.92 a	100
Metformina 100mg/Kg	26.36 ± 5.9 b	100 ± 5.9 b	75.08
EOHSC mg/Kg			
2	1.35 ± 1.05 c	5.12 ± 4.3 c	97.55
4	20.53 ± 7.78 b	77.9 ± 29.51 b	83.67
8	2.27 ± 2.16 c	8.6 ± 3.23 c	93.0

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre dosis ($P \leq 0.05$), donde ($a \neq b$ y c), ($b \neq a$ y c) y ($c \neq a$ y b); ($n=6$). EOHSC = Extracto alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*.

En la figura 16 se muestra el gráfico correspondiente a la curva de tolerancia a la glucosa, con las dosis de 2, 4 y 8 mg/Kg de EOHSC en animales diabéticos tipo 2 y en la figura 17 se ilustran los mismos resultados normalizados, puede observarse el grupo control negativo muestra un incremento de la glucemia durante toda la prueba, en cambio el control positivo tratado con metformina presenta reducción de la glucosa desde lo primero 120 minutos de la prueba, cada una de las dosis evaluadas presento reducción de la concentración de glucosa en diferentes porcentajes, observando que la dosis de 4mg mg/Kg presenta similitud con el grupo control positivo, siendo la mejor dosis hipoglucemiante del extracto alcohólico.

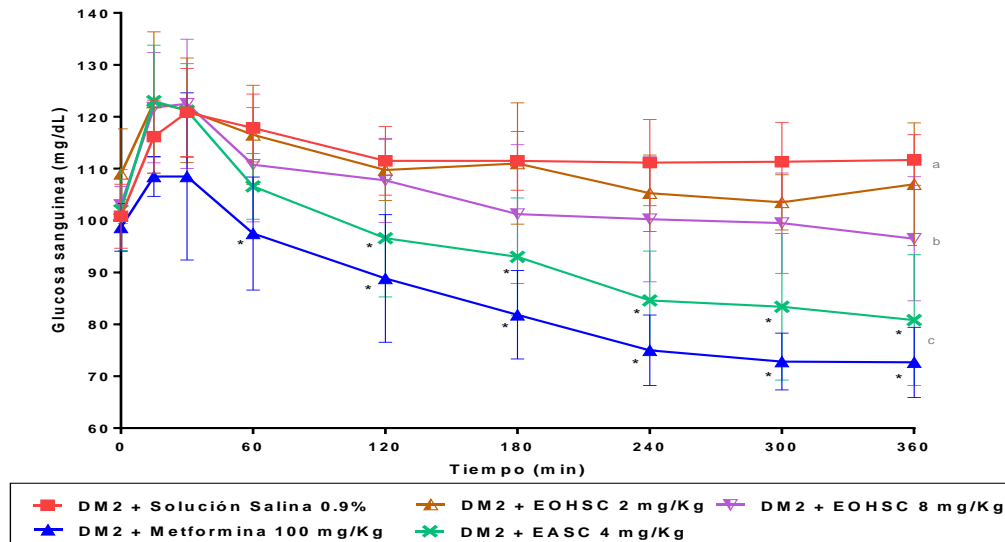


Figura 16. Curva de tolerancia a la glucosa con extracto alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata* en modelo de diabetes tipo 2. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

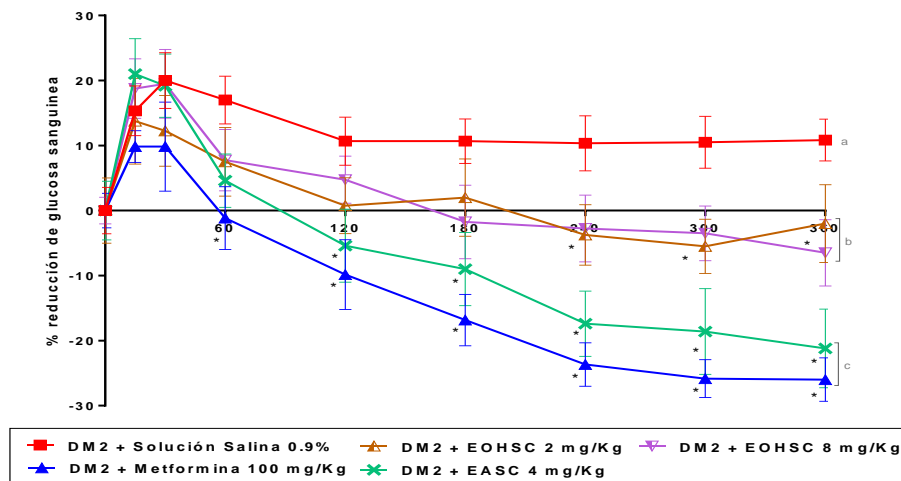


Figura 17. Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea en animales diabéticos con el extracto alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

Tabla 10. Porcentajes de reducción y área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa de extractos de hojas de *Spathodea campanulata*

	Reducción (%) [] inicial y final glucosa	Reducción (%) En relación a metformina	Área bajo la curva (%)
Solución salina 0.9%	0 ± 2.92 a	0 ± 2.92 a	100
Metformina 100mg/Kg	26.36 ± 5.9 b	100 ± 5.9 b	75.08
EAQSC 300 mg/Kg	22.66 ± 7.51 b	86.00 ± 4.38 b	81.29
EASC 4 mg/Kg	16.63 ± 5.58 c	63.08 ± 21.19 c	84.90
EOHSC 4 mg/Kg	20.53 ± 7.78 b	77.90 ± 29.51 b	83.67

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre dosis ($P \leq 0.05$), donde ($a \neq b$ y c), ($b \neq a$ y c) y ($c \neq a$ y b); ($n=6$). EAQSC = Extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*. EASC = Extracto acetónico de hojas de *Spathodea campanulata*. EOHSC = Extracto alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata*.

En la tabla 10 se muestran los resultados, incluyendo porcentajes de reducción de glucosa y área bajo la curva en las curvas de tolerancia a la glucosa, en condiciones de control, así como los efectos de la administración de metformina y las dosis de los diferentes extractos de *Spathodea campanulata* con mejor efecto hipoglucemiante. Puede observarse que de los tres extractos evaluados en sus diferentes dosis, el extracto acuoso (300mg/Kg) presenta la mejor reducción de glucosa sanguínea en ratas diabéticas tipo 2.

6.4.2 Curvas de glucosa en ayuno

En la figura 18 se muestra el gráfico correspondiente a la curva de glucosa en ayuno, con las dosis de los diferentes extractos de *Spathodea campanulata* con mejor efecto hipoglucemiante, en animales diabéticos tipo 2. Puede observarse la reducción de la glucemia en todos los grupos de estudio, los extractos muestran un control de la glucemia durante el ayuno.

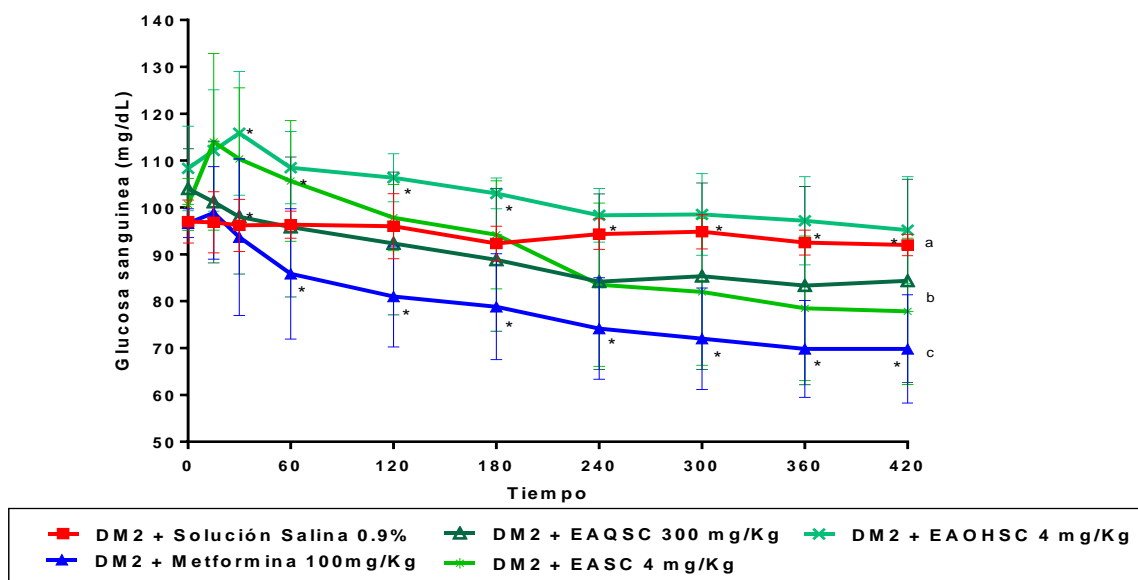


Figura 18. Curva de glucosa en ayuno con extractos acuoso, acetónico y alcohólico de hojas de *Spathodea campanulata* en modelo de diabetes tipo 2.

Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos diferencias significativas entre el tiempo cero y el resto de los tiempos dentro de cada grupo ($P \leq 0.05$).

Una vez demostrado que el extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* presenta capacidad hipoglucemiante (administración aguda), se administró de forma crónica durante quince semanas cada 24 horas, monitoreando el peso, la glucosa sanguínea, hemoglobina glicosilada y diez parámetros de orina. Los resultados se describen a continuación.

6.5 Administración crónica del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*.

6.5.1 Peso de los animales y glucosa sanguínea

La figura 19 muestra los valores del peso corporal de los grupos en las diferentes condiciones experimentales, puede observarse un aumento del peso tanto en animales sanos, como los grupos tratados con extractos o metformina, con diferencias significativas entre el grupo sanos y los otros grupos experimentales desde el inicio hasta la cuarta semana del estudio, sin diferencias significativas

entre grupos de la 5^a a la 15^a semana. El curso temporal del incremento de peso durante el estudio, puede interpretarse como mantenimiento de un buen estado general sin diferencias en la ingesta de alimento, lo que sería compatible con la ausencia de efectos tóxicos debidos a la administración de extractos a largo plazo.

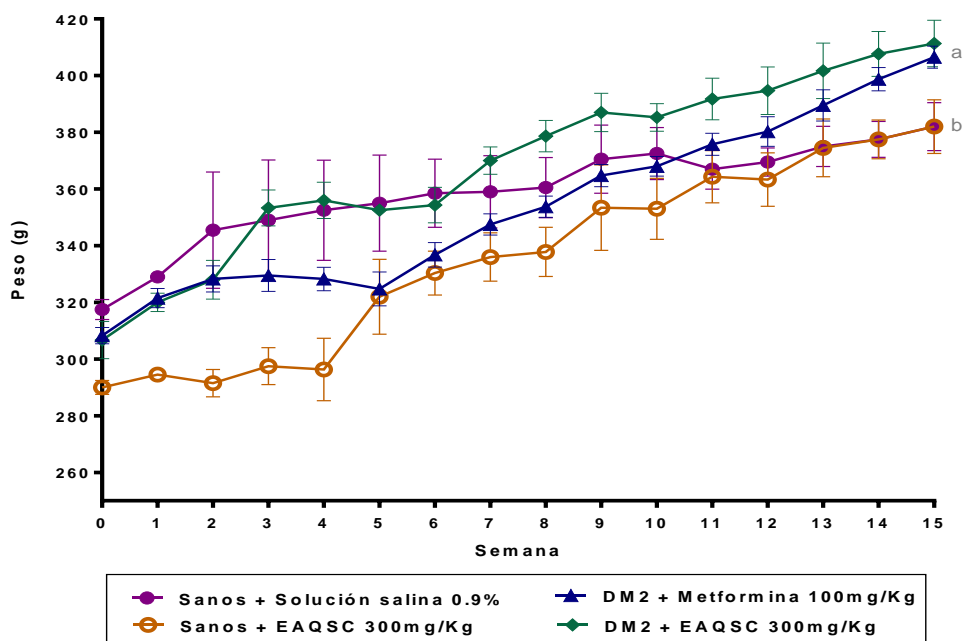


Figura 19. Peso de animales durante la administración crónica de extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos, donde a \neq b (P \leq 0.05).

La figura 20 y 21 muestra los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de glucosa sanguínea determinada en ayuno cada semana en diferentes condiciones experimentales. Puede observarse la disminución de la glucosa sanguínea, hasta valores normales, por efecto del EAQSC de manera similar al mismo efecto inducido por la administración de metformina en los grupos de animales con Diabetes, a partir de la segunda semana de tratamiento. La administración crónica de EAQSC no provocó modificaciones en la concentración de glucosa en sangre en los animales sanos.

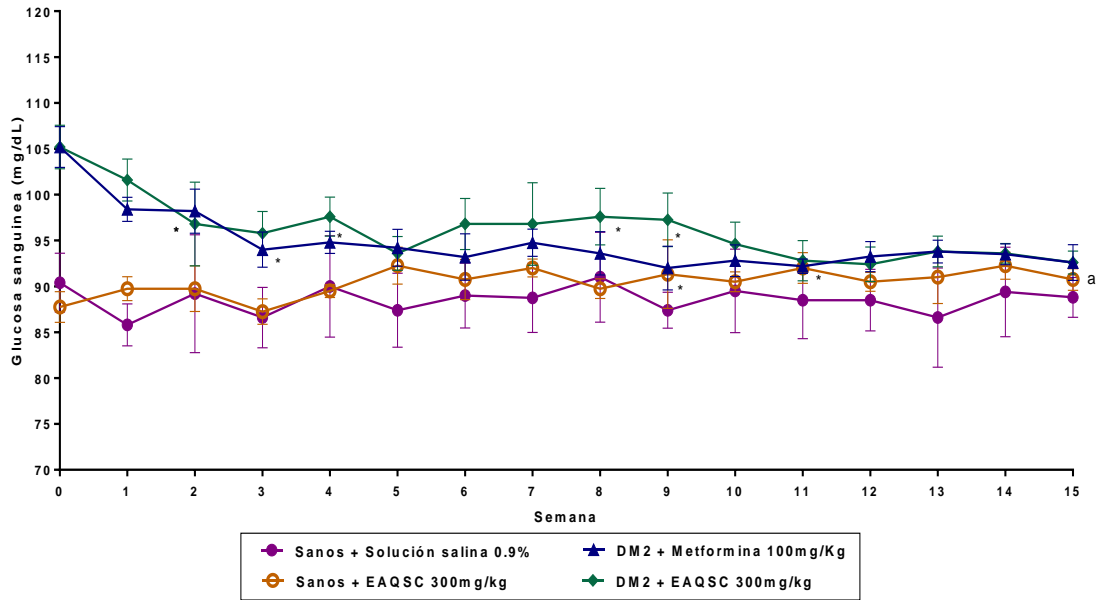


Figura 20. Glucosa sanguínea correspondiente a la administración crónica del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos y los asteriscos entre los tiempos ($P \leq 0.05$).

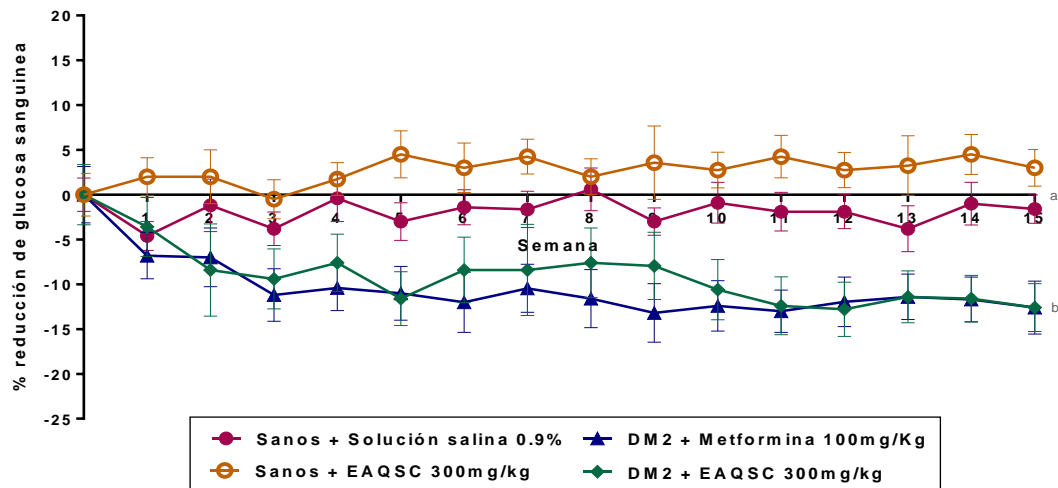


Figura 21. Normalización de datos expresado en porcentaje de reducción de glucosa sanguínea de administración crónica con el extracto acuosos de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Las letras minúsculas representan las diferencias significativas entre los grupos, donde $a \neq b$ y los asteriscos entre los tiempos ($P \leq 0.05$).

La figura 22 muestra los resultados de la determinación de glucosa sanguínea al iniciar (tiempo cero) y finalizar el estudio de administración en cada uno de los grupos experimentales. Puede observarse que las concentraciones de glucosa en sangre no variaron significativamente y se mantuvieron dentro de valores normales en animales sanos tratados con solución salina o con EAQSC; en cambio en los animales diabéticos, con valores iniciales de glucosa anormalmente altos, la administración de metformina o EAQSC redujo los valores concentración de glucosa en sangre hasta valores normales al final del tratamiento.

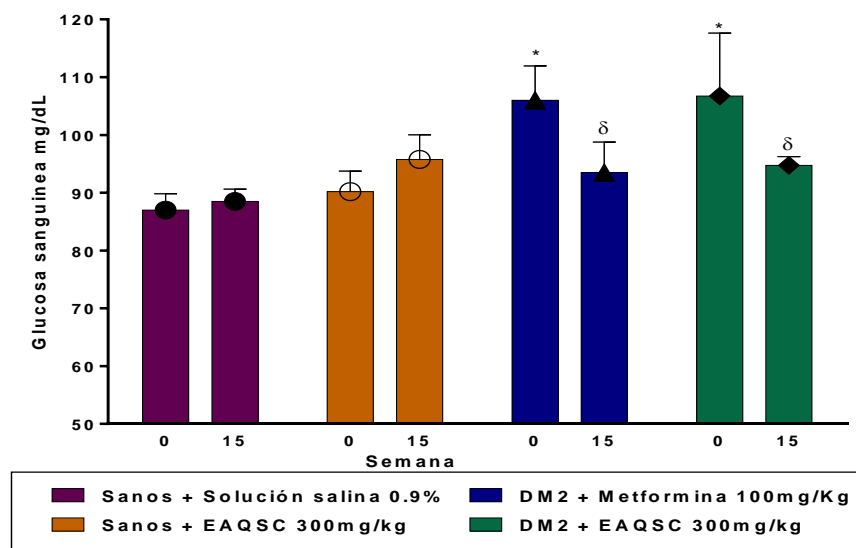


Figura 22. Glucosa sanguínea correspondiente al inicio y final de la administración crónica de extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo sano y δ diferencias significativas respecto a la semana cero de tratamiento (P \leq 0.05).

6.5.2 Hemoglobina glicosilada

La figura 23 muestra los resultados de la determinación de hemoglobina glicosilada (porcentaje de glucosa unida a hemoglobina) obtenidos en diferentes condiciones experimentales. Puede observarse el incremento anormal de los valores de hemoglobina glicosilada en el grupo de animales diabéticos tratados

con solución salina y la reducción significativa de dichos valores, hasta valores similares a los observados en animales sanos, por efecto de la administración crónica de EAQSC o metformina. Cabe destacar que siendo la hemoglobina glicosilada un marcador de control de la glucemia por tres meses, se considera que la glucosa sanguínea comenzó a regularse desde las semanas iniciales del tratamiento.

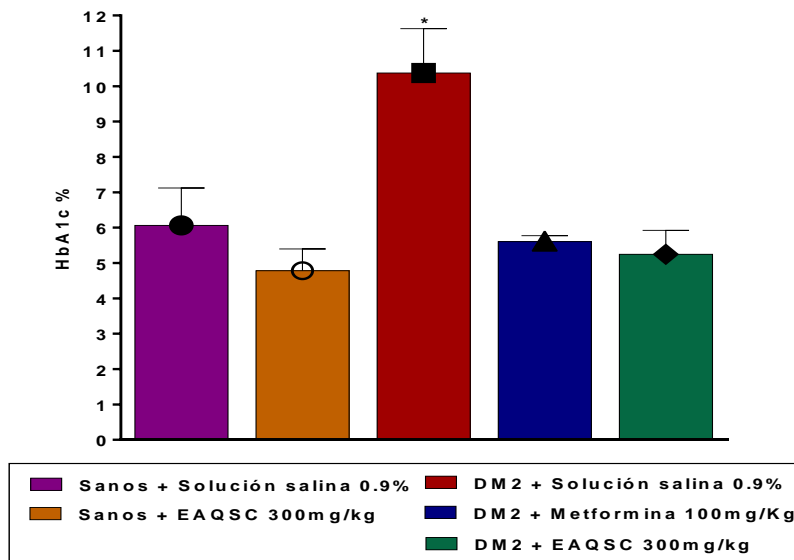


Figura 23. Hemoglobina glicosilada de los grupos experimentales posterior a la administración crónica de extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Los asteriscos representan las diferencias significativas con respecto al grupo control sano ($P \leq 0.05$).

6.5.3 Evaluación de los parámetros de orina

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos a partir de la determinación de cada uno de los diez parámetros de orina, al inicio y al término del tratamiento. El análisis comparativo de estos valores muestra una reducción significativa de las alteraciones de estos parámetros en los grupos de animales diabéticos por la administración crónica de EAQSC o metformina.

Tabla 11. Parámetros de orina al inicio y final del tratamiento crónico con extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*.

	Diabetes mellitus 2 experimental	
	Inicio de administración crónica	Final de administración crónica
Parámetros en sangre		
Glucosa sanguínea (mg/dL)	> 100	< 100 (94.75 ± 1.5)
Hemoglobina glicosilada (%)	>6.5	< 6.5 (5.2 ± 0.67)
Parámetros en orina		
Densidad	1.010-1.020	1.010-1.020
pH	5 - 7	5 – 7
Leucocitos (Leuco/μL)	Negativo	Negativo
Nitritos	Negativo	Negativo
Proteínas (mg/dL)	30 -100	0 – 30
Glucosa (mg/dL)	Negativa	Negativa
Cetonas (mg/dL)	15 - 40	0 – 5
Urobilinógeno (UE)	Normal	Normal
Bilirrubinas	Negativo	Negativo
Eritrocitos (Ery/μL)	Negativo	Negativo
Hemoglobina (Ery/μL)	50	0-10

En las figuras 24, 25 y 26 se muestra el curso temporal de la variación de los valores de tres de los parámetros (proteínas, cetonas y hemoglobina) determinados en orina en los diferentes grupos de estudio, durante la administración crónica del EAQSC o metformina. Puede observarse la alteración

de los valores de estos parámetros en los grupos con DM2, así como la modificación con tendencia progresiva hacia valores normales en el curso de las quince semanas de tratamiento con EAQSC o metformina.

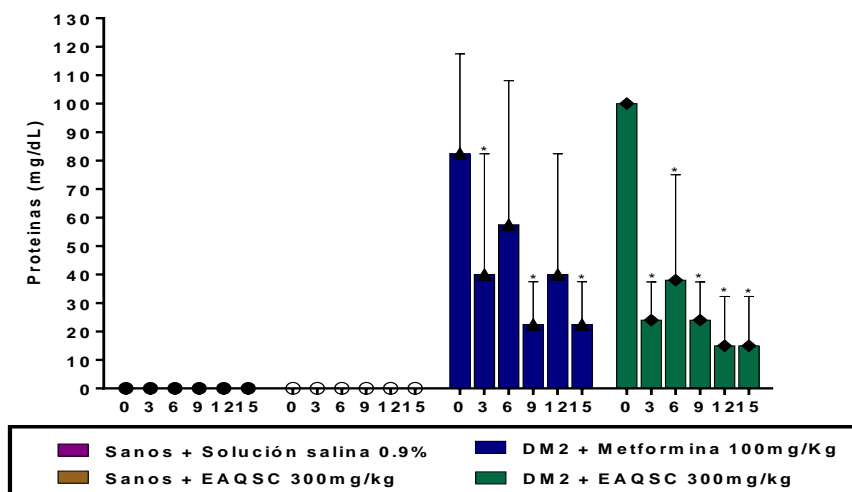


Figura 24. Proteínas en orina de los grupos experimentales en administración crónica de extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la semana cero de tratamiento ($P \leq 0.05$).

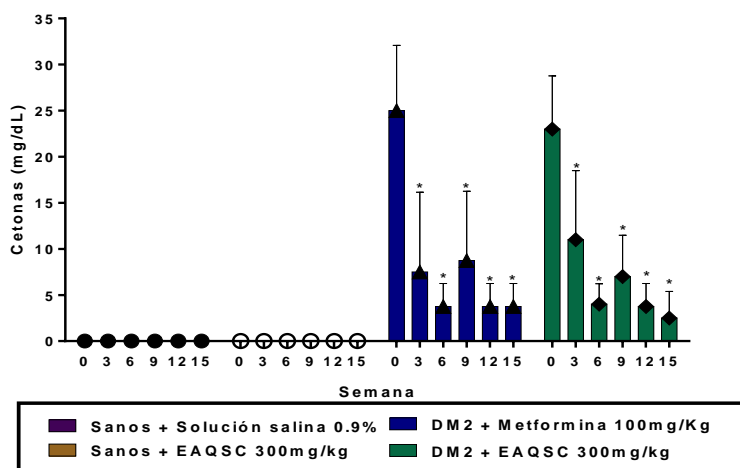


Figura 25. Cetonas en orina de los grupos experimentales en administración crónica de extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y

metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la semana cero de tratamiento ($P \leq 0.05$).

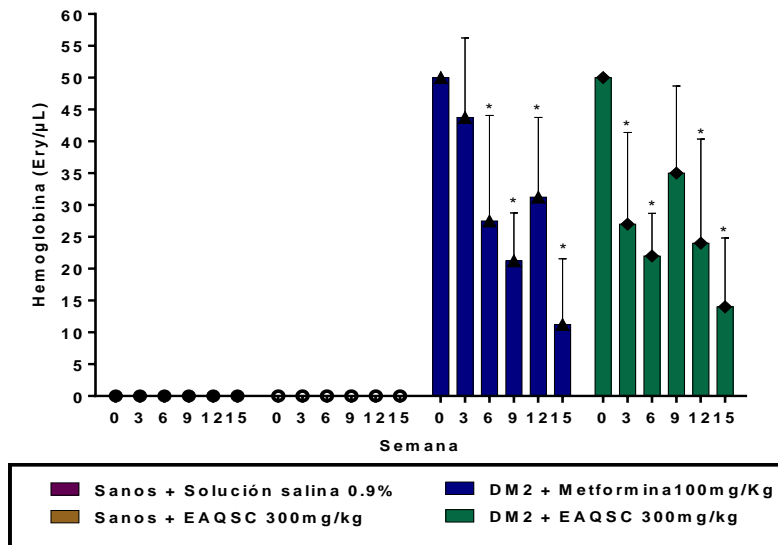


Figura 26. Hemoglobina en orina de los grupos experimentales en administración crónica de extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* y metformina. Los datos representan la media \pm DE (n=6). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto a la semana cero de tratamiento ($P \leq 0.05$).

6.6 Evaluación de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo.

En la Figura 33 se muestran fotomicrografías de cortes coronales del cerebro (40x), que ilustran el aspecto general del hipocampo en individuos representativos de diferentes condiciones experimentales (A); así como, a mayor amplificación (400x) (B), partes del estrato piramidal a nivel del CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo. Puede observarse el aspecto de las neuronas piramidales normales (tinción de violeta de cresilo) en el animal sano y la abundante presencia de neuronas picnóticas en el animal con DM2 tratado con solución salina; así como la variación en la apariencia de la proporción de neuronas normales y neuronas picnóticas bajo condiciones de tratamiento con EAQSC o metformina.

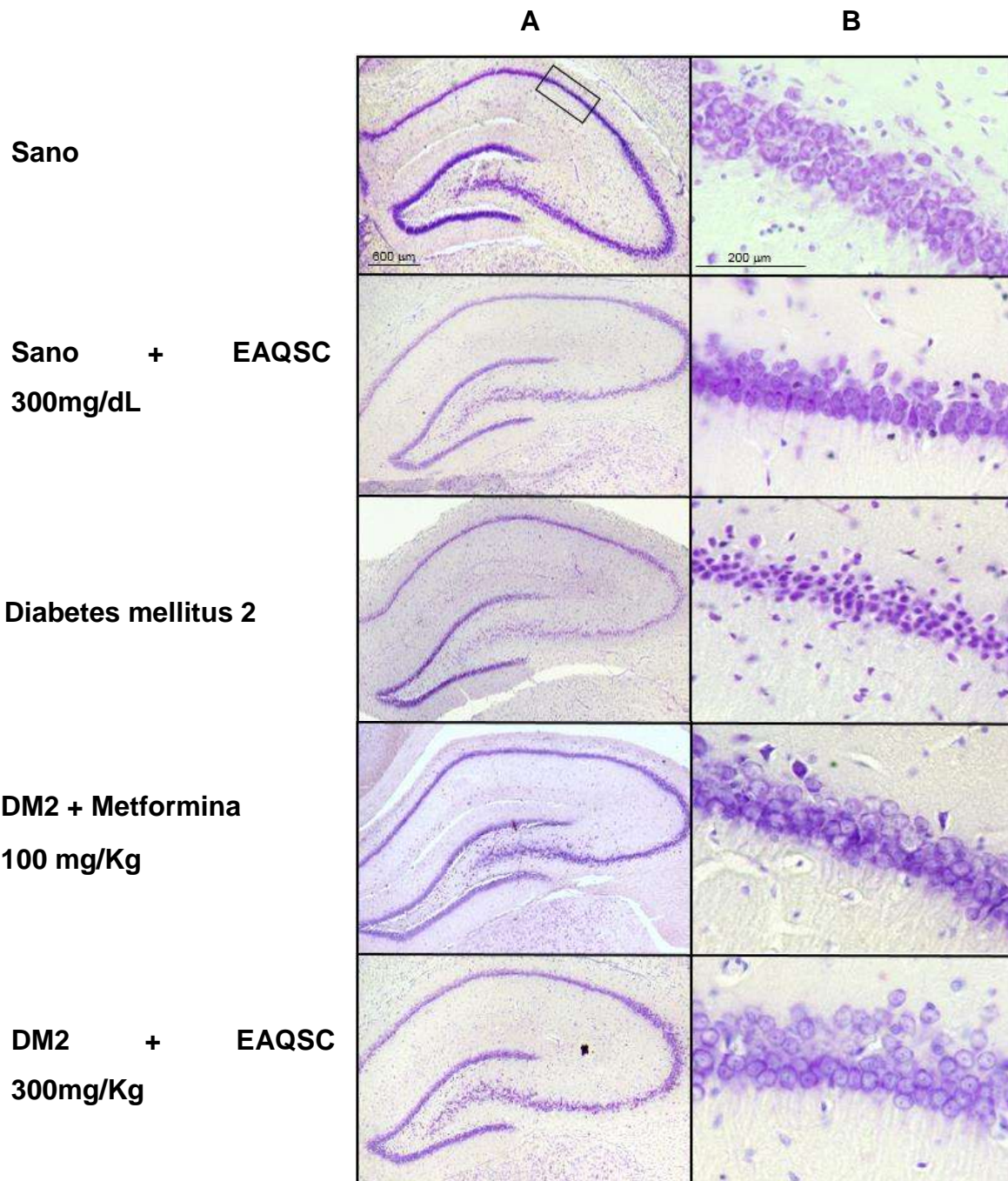


Figura 27. Cortes histológicos del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales. Dos diferentes aumentos, 40x del lado izquierdo y 400x del lado derecho.

La tabla 12 y la figura 27 muestran los resultados del conteo neuronal (número de neuronas normales) y porcentaje con respecto al resultado obtenido en el grupo de animales sanos (100%), en diferentes condiciones experimentales. Puede observarse la reducción significativa de neuronas en los animales diabéticos en comparación con los animales sanos, el grupo sano tratado con el extracto no presentó cambios con respecto al grupo sano; ambos grupos de animales diabéticos tratados con metformina y EAQSC, no presentan diferencias significativas al compararse con grupo diabético, sin embargo se observa una tendencia de incremento del número de neuronas piramidales íntegras del segmento CA1 del hipocampo.

Tabla 12. Número de neuronas íntegras y porcentajes en el segmento CA1 del hipocampo.

Grupo	Neuronas íntegras	%
Sanas + Solución salina 0.9%	201.15 ± 16.61	100.00
Sanas + EAQSC 300 mg/kg	196.40 ± 4.93	98.70
DM2 + Solución salina 0.9%	121.10 ± 1.46 **	60.20
DM2 + Metformina 100 mg/kg	148.40 ± 5.16 **	74.67
DM2 + EAQSC 300 mg/kg	137.60 ± 2.41 **	73.28

Los datos representan la media ± DE (ensayos n=4). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control sano, * P ≤0.05 y ** P ≤0.0001. Los datos corresponden a una extensión lineal de 600 µm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo.

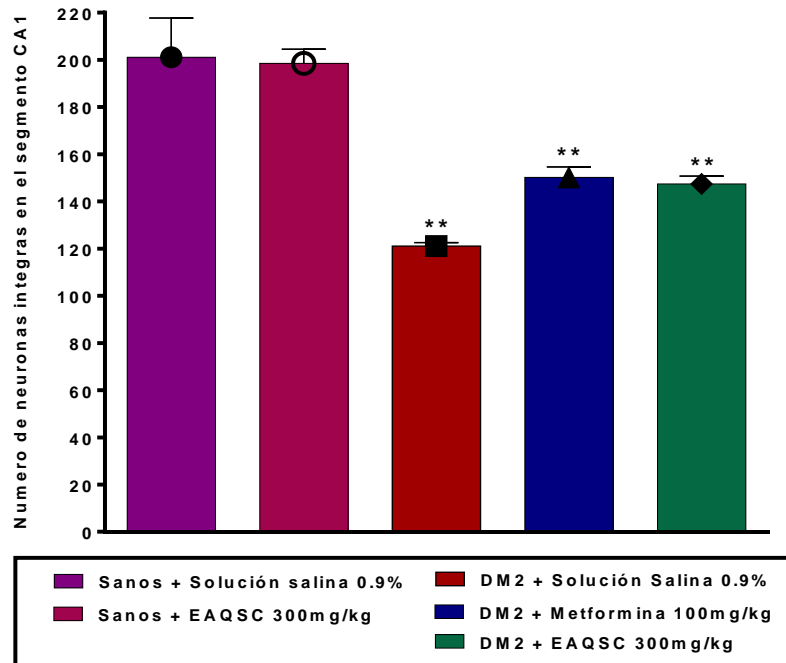


Figura 28. Número de neuronas piramidales íntegras. Los datos corresponden a una extensión lineal de 600 μm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo de los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media \pm DE (n=4). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control sano, * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.0001$.

La tabla 13 y la figura 35 muestran los resultados del conteo neuronal (número de neuronas lesionadas (picnóticas) y porcentaje con respecto al resultado obtenido en el grupo de animales diabéticos (100%), en diferentes condiciones experimentales. Puede observarse para los grupos tratados con metformina y EAQSC presentan una reducción significativa del número de neuronas lesionadas esto comparación con el grupo de animales diabéticos, el grupo control sano y el grupo sano tratado con extracto presentan un número nulo de neuronas lesionadas.

Tabla 13. Número de neuronas lesionadas y porcentajes en el segmento CA1 del hipocampo.

Grupo	Neuronas en lesión	%
Sanas + Solución salina 0.9%	0 ± 1.71	0
Sanas + EAQSC 300 mg/kg	0 ± 2.59	0
DM2 + Solución salina 0.9%	50.3 ± 1.40 **	100
DM2 + Metformina 100 mg/kg	34.2 ± 2.40 *	64.21
DM2 + EAQSC 300 mg/kg	36.0 ± 5.15 *	58.84

Los datos representan la media ± DE (ensayos n=4). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control sano, * P ≤0.05 y ** P ≤0.0001. Los datos corresponden a una extensión lineal de 600 µm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo.

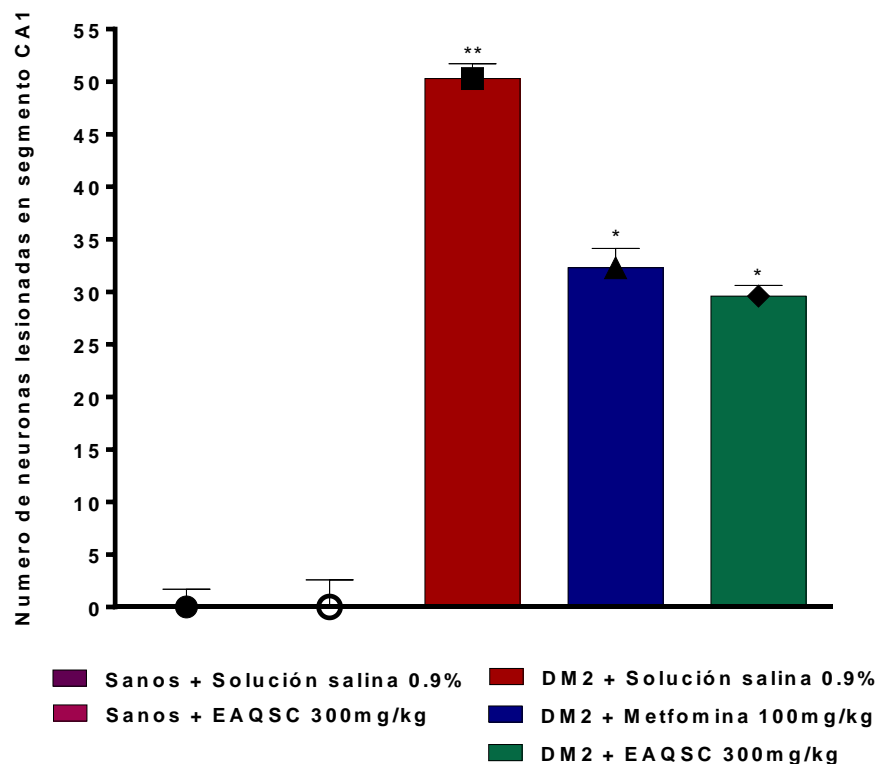


Figura 29. Número de neuronas piramidales lesionadas. Los datos corresponden a una extensión lineal de 600 µm en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo de los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media ± DE (n=4). Los asteriscos representan las diferencias significativas respecto al grupo control sano, * P ≤0.05 y ** P ≤0.0001.

VII. Discusión

En el presente trabajo se evaluaron por primera ocasión el efecto hipoglucemiante de los extractos acuoso, acetónico y alcohólico de las hojas de *Spathodea campanulata*, así como el efecto neuroprotector del extracto acuoso de la planta, en ratas diabéticas (modelo de diabetes tipo 2).

En primera instancia se cuantificaron fenoles, polifenoles y flavonoides de la planta en estudio, cuyas concentraciones medias de metabolitos secundarios resultaron comparables con las de otras dos plantas de la misma familia *Tecoma stans* y *Jacaranda mimosifolia* (Alonso-Castro et al., 2010, Rana et al., 2013, Mohamed et al., 2013).

Precisar la cantidad de compuestos secundarios de la planta en estudio se debe a la importancia de estos componentes en los benéficos para la salud, como son fenoles, polifenoles y flavonoides. (Mozaffarian and Wu, 2018; Sandoval-Ávila et al., 2019).

Además del extracto acuoso se obtuvieron los extractos acetónico y alcohólico, para su obtención se realizaron lavados a las hojas de *Spathodea campanulata* con acetona y posteriormente con alcohol. El tratamiento con solventes polares como lo son la acetona y el alcohol, asegura la separación de componentes presentes en las plantas como fenoles, polifenoles, flavonoides, carotenoides, antocianinas, clorofila, proteínas, carbohidratos, entre otros. Se implementa el uso de solventes capaces de disolver los compuestos sin dañar su estructura, con un punto de ebullición bajo y que se pueda eliminar con eficacia para facilitar la recuperación de dichos componentes (Delgado-Vargas et al., 2000), la técnica empleada para recuperar los compuestos disueltos en los solventes es la destilación simple. El extracto alcohólico a diferencia del resto presenta una cantidad elevada, esto debido a que los fenoles, polifenoles y flavonoides son de naturaleza polar, por lo que se pueden extraer con facilidad y en mayor

concentración utilizando como solvente a la acetona, concentrándose así la mayor cantidad de flavonoides en tal pigmento.

Una vez cuantificados fenoles, polifenoles y flavonoides en las hojas de *Spathodea campanulata*, se prosiguió a la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuoso, acetónico y alcohólico. De acuerdo a la clasificación propuesta por Sánchez-Moreno et al., 1998, la eficiencia antirradical con abreviatura EA ($1/EC_{50} * TEC_{50}$), plantea lo siguiente: $<1 \times 10^{-3}$ baja; 1×10^{-3} a 5×10^{-3} media; EA 5×10^{-3} a 10×10^{-3} alta, falta; el extracto acuoso y acetónico poseen una eficiencia antirradical (EA) alta, mientras que el extracto alcohólico presenta una EA media. Se evaluó el comportamiento en tiempo contra porcentaje de inhibición de DPPH, ácido ascórbico y cada uno de los extractos de hojas de *Spathodea campanulata* fueron evaluados, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes extractos.

Para mantener el buen estado de salud y mejorar las condiciones de enfermedades crónicas, además de la alimentación y ejercicio, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, recomienda una ingesta diaria de quercetina de 75mg, fenoles y polifenoles de 20mg a 1g, por lo cual el extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* atendería a las recomendaciones de consumo para tales compuestos secundarios (AESAN. 2011; Navarro-González et al., 2017).

La cantidad de fenoles, polifenoles y flavonoides presentes en las plantas está relacionada con el control de la glucemia, tales compuestos secundarios favorecen la homeostasis de la glucosa actuando en diferentes órganos diana, a nivel intestinal al inhibir la acción de alfa amilasa y beta glucosidasa, generando secreción de insulina o mejorando la captación de glucosa en órganos periféricos (Hanhineva et al., 2010; Kim et al., 2016; Laguna et al., 2017; Mozaffarian and Wu, 2018). Una vez cuantificados los compuestos del metabolismo secundario de la planta en estudio, se dio inicio a la evaluación del efecto hipoglucemiante agudo

de los distintos extractos obtenidos de las hojas de *Spathodea campanulata*. Para ello se indujo en ratas un modelo de diabetes tipo 2 con administración *ad libitum* de fructosa al 60%, posterior a cuatro semanas de consumo, se considera establecido el modelo en aquellos animales con glucosa sanguínea mayor de 100 mg/dL, presencia en orina de proteínas (30 -100 mg/dL), cuerpos cetónicos (40 – 80 mg/dL) y hemoglobina (10 Ery/ μ L) (Dupas et al., 2016; Shah et al., 2019; Wians, et al., 2019). En la semana número cuatro, se observa un incremento significativo de la glucosa sanguínea, se mantiene elevada sobre el punto inicial (animal sano).

Las curvas de tolerancia la glucosa y las curvas de glucosa en ayuno permitieron comprobar el efecto hipoglucemiante de distintas dosis del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*. Los animales tratados durante el ensayo con solución salina 0.9 % muestran una reducción de la glucosa del 0%, tras administrar la carga de glucosa, no logran descender la concentración sanguínea a lo largo de la prueba, en cambio, los animales diabéticos tratados con metformina 100 mg/Kg normalizaron sus niveles de glucosa en sangre a los 120 minutos con una reducción total del 26.36%. De las múltiples dosis evaluadas la dosis de 300 mg/Kg presentó el mejor control de glucemia en los animales diabéticos tipo 2.

Metformina es un medicamento que actúa por tres mecanismos, retrasa la absorción intestinal de glucosa, reduce la producción hepática de glucosa y en el músculo incrementa la sensibilidad a insulina, mejorando la captación de glucosa periférica (Vademécum. 2016); al presentar similitud el grupo tratado con extracto y el tratado con metformina, en cuanto al tiempo de acción y porcentaje de reducción de glucosa sanguínea, figura que el extracto acuoso de *Spathodea campanulata*, actúa en el control de la glucemia por uno o varios de los mecanismos que emplea tal fármaco.

Diversos estudios demuestran la capacidad de los compuestos secundarios, para inhibir enzimas digestivas como la α -amilasa y α -glucosidasa, estos compuestos pueden establecer interacciones no covalentes con las enzimas debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con el grupo polar de la enzima, modificando su función, de esta manera se reduce la tasa de liberación de glucosa, su absorción en el intestino delgado y en consecuencia se reduce la hiperglucemia crónica, tal mecanismo de acción podría ser por el cual los compuestos secundarios de *Spathodea campanulata* ejercen su efecto hipoglucemiante. Además los metabolito secundarios pueden reducir la actividad de glucosa-6-fosfatasa en hepatocitos, enzima encargada de regular la gluconeogénesis y glucogenólisis, por tanto control de la glucemia, pueden influir en la homeostasis de glucosa a nivel de músculo esquelético favoreciendo translocación de GLUT-4 y mediante mecanismos asociados con la activación de vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y mejoran la captación de Ca^{2+} en las células β pancreáticas, propiciando así la liberación de insulina (Hanhineva et al., 2010; Andrade-Cetto, A., 2012; Xiao and Högger 2014; Yang and Kang, 2018; Mozaffarian and Wu, 2018).

En animales sanos, buen control de la glucemia posterior a la administración de la descarga de glucosa y la dosis a probar, no existe un aumento en las concentraciones de glucosa durante el ensayo, comprobando de esta manera que extracto acuoso no activa la glucogenolisis hepática, además de no mostrar ningún comportamiento referente a toxicidad.

El extracto acetónico en la dosis de 4 mg/dL presento el mejor control de la glucemia con una reducción del 16.63%, normalizando los valores a los 180 minutos. El extracto alcohólico de las hojas de *Spathodea campanulata* obteniendo la mejor reducción de la glucemia con la dosis 4 mg/Kg, 20.53% con glucosa sanguínea normalizada a los 240 minutos. Los animales sanos tratados con extracto acetónico, presentan la no reducción de glucosa sanguínea sino

hasta el minuto 360; los animales sanos tratados con extracto alcohólico presentan el mismo comportamiento de no reducción de la glucemia tras la carga de glucosa a pesar de ser animales sanos, esto podría deberse a la presencia de carbohidratos procedentes de la planta que se alojan en cada uno de los pigmentos tanto acetónico como alcohólico. Los carbohidratos pueden formar conjugados con metabolitos secundarios como los flavonoides, esta unión les confiere resistencia durante el proceso de digestión (hidrolisis del estómago) y favorece su llegada al intestino donde son absorbidos (Delgado-Vargas et al., 2000; Shivashankara y Acharya, 2010; Marín et al., 2015).

La absorción de los compuestos secundarios juega un papel importante en la actividad hipoglucemiante de los compuestos secundarios. La mayoría de los compuestos secundarios son resistentes a los ácidos estomacales, llegando al intestino de forma nativa donde se absorben un 10% al torrente sanguíneo, y el 90% de la absorción se realiza a nivel de intestino grueso, tal condición de biodisponibilidad se relaciona como los tiempos de acción del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*, ya que la normalización de la glucemia se lograba alrededor de los 180 minutos. La acción que ejecutan los compuestos secundarios sobre los mecanismos de homeostasis de la glucosa se ven involucrados en la acción dosis ideal hipoglucemiante, ya que al sobrepasar las concentraciones plasmáticas medias y sobresaturar dichos mecanismos (intestinales, pancreáticos, de musculo o tejido adiposo) comienza el descenso de la efectividad de las dosis de alta concentración; el tiempo de acción y concentración es similar a lo reportado por Hoda en 2019. (Hoda et al., 2019; Orozco et al., 2019; Calani et al 2012).

Realizando una comparación con base en el control de la glucemia de los tres extractos obtenidos de las hojas de *Spathodea campanulata*, el extracto acuoso resulto tener un mejor control en los niveles de glucosa sanguínea circulante durante el ensayo, denominando tales pruebas como agudas al realizarse en una sola exposición a cada uno de los extractos.

La curva de glucosa en ayuno se realiza administrando la muestra problema sin la carga de glucosa 75 mg/Kg, a diferencia de las curvas de tolerancia la glucosa esta prueba se extiende hasta los 420 minutos. Se pusieron en prueba las dosis de los tres extractos con mejor reducción de glucosa sanguínea en el modelo de diabetes tipo 2, del extracto acuoso 300 mg/Kg, acetónico y alcohólico 4 mg/Kg. Los tres extractos reducen la concentración de glucosa inicial y durante la prueba no presentan ascensos o descensos súbitos de glucosa en sangre, ya que el ayuno es un factor modificador de la glucemia de la diabetes mellitus 2, por lo cual los tres extractos mantienen las condiciones de homeostasis de la glucosa en control a pesar del ayuno, ya sea inhibiendo las posibles hipoglucemias o hiperglucemias durante la prueba (Alberto, et al., 2004; Figueroa-García et al., 2016; Fenton-Navarro et al., 2018).

Una vez determinada la positiva actividad hipoglucemiante de la planta se procedió a la administración a largo plazo del extracto acuoso de hojas *Spathodea campanulata*, se realizó durante quince semanas, la administración crónica no compromete el estado fisiológico del animal y su estado de salud se encuentra reflejado en el apetito y por consiguiente en la ganancia de peso.

Con relación a la concentración de glucosa sanguínea durante la administración crónica, en la tercera semana se comenzaban a normalizar los valores de glucemia, logrando estabilizar la glucosa en sangre hasta la doceava semana, con una reducción total del 11.24%. Los animales diabéticos posterior al tratamiento muestran una reducción significativa de la glucemia, además un cambio significativo en los valores de hemoglobina glicosilada, los animales diabéticos presentaban valores mayores a 9% y posterior al tratamiento los valores de hemoglobina glicosilada oscilaron menores a 6%, comprobando el control glucémico durante la administración crónica. Las concentraciones de glicohemoglobina en animales diabéticos (tiempo cero) señala una hiperglucemia crónica, en cambio, en los grupos diabéticos administrados con el extracto y

metformina, la disminución significativa en la concentración de glicohemoglobina, corrobora la normalización de la glucemia desde las primeras semanas de tratamiento, ya que tal prueba nos indica la adición de glucosa a la cadena β de la hemoglobina en un periodo de tres meses.

Los parámetros de orina al comienzo de la fase experimental crónica en animales diabéticos mostraba el deterioro correspondiente al establecimiento del modelo de diabetes tipo 2, los parámetros de densidad y pH se encontraron normales en todos los grupos de estudio, ambos parámetros indican la inexistencia de algún proceso de deshidratación que modificaría de manera importante el funcionamiento renal de los animales, dejando en certeza que el resto de los parámetros son referentes al daño causado por las hiperglucemias. Las proteínas, cuerpos cetónicos y hemoglobina en orina, al inicio del tratamiento se encontraban en intervalos significativos del modelo de diabetes tipo 2, después del tratamiento los parámetros disminuyeron de forma significativa demostrando que el control en la glucemia mejora directamente el estado fisiológico del animal.

Respecto a las alteraciones de la estructura del hipocampo, en animales con diabetes tipo 2, confirman la reducción de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon como consecuencia del periodo de consumo de fructosa al 60%, como ha sido descrito por diversos autores (Stranahan et al., 2008; Ross et al., 2009; Hsu et al., 2015). En relación con el número de neuronas íntegras en animales sanos (100%), los animales con diabetes mellitus 2 presentan un 60% de neuronas íntegras, una reducción del 40% en presencia de esta enfermedad. La hiperglucemia crónica genera estrés oxidativo, la lipoperoxidación de estructuras neuronales, la activación de procesos pro-inflamatorios, así como activación de mecanismos pro-apoptóticos son considerados fenómenos concurrentes del daño neuronal, observado en el presente estudio se corrobora el daño neuronal en dicha estructura, debida a estos mismos procesos fisiopatológicos (Farkas et al., 2007).

Posterior al tratamiento el grupo diabético administrado con metformina 100 mg/Kg presento un porcentaje de neuronas íntegras de 73.78% y el grupo diabético tratado con el extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata* obtuvo un porcentaje de 68.41%, comparando los resultados con los animales diabéticos no se muestran diferencias significativas con tal grupo, no obstante, se observa un pequeño incremento en el número de neuronas íntegras contabilizadas. Los animales sanos tratados con el extracto no presentaron reducciones considerables en el conteo de neuronas íntegras lo cual indica no toxicidad para las neuronas del segmento CA1 del cuerno de Ammon.

Considerando ahora a las neuronas lesionadas se observó que los animales diabéticos presentaron un incremento significativo en picnosis y ruptura de membrana celular en comparación con los animales sanos. Respecto al grupo tratado con metformina, el efecto benéfico que se presentó se debe a la reducción de la glucosa circulante que genera, lo que provoca una reducción del estrés oxidativo a nivel sistémico, en el caso de los animales tratados con extracto acuoso de esta planta, presentan una reducción significativa del número de neuronas lesionadas; al demostrar su contenido de metabolitos secundarios (tabla 2, 3 y 4), se relaciona ya que estos compuestos secundarios disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF- α disminuyendo los procesos inflamatorios en el cerebro; inhiben el proceso de apoptosis de las neuronas al disminuir la expresión de caspasa 3, la vía JNK y la relación de Bax/Bcl, además de presentar una importante capacidad antioxidante debido a su estructura química con múltiples grupos hidroxilo fenólicos, los que confieren propiedades de quelación, captando una serie importante de radicales libres (Martínez-Flórez et al., 2002; Sattanathan et al., 2011; Sandoval-Ávila et al., 2019).

VIII. Conclusiones

Los extracto acuoso, acetónico y alcohólico de las hojas de *Spathodea campanulata*, ejercen un efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes mellitus tipo 2 y comprobada capacidad antioxidante *in vitro*, siendo el extracto acuoso el de mayor efecto en la reducción de glucosa sanguínea y efecto antioxidante, tales propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes se relacionan con la concentración media de compuestos secundarios, lo anterior en comparación con *Tecoma stans*, planta perteneciente a su familia.

La administración crónica del extracto acuoso de hojas *Spathodea campanulata*, ejerce un control positivo sobre el síndrome metabólico causado por la diabetes mellitus tipo 2 en ratas, además de reducir el daño presente en hipocampo (CA1) en animales con diabetes mellitus tipo 2, sustentando así un efecto neuroprotector.

IX. Perspectivas

- Identificar el compuesto responsable del efecto hipoglucemiante de *Spathodea campanulata*
- Evaluar la actividad antioxidante *in vivo* del extracto acuoso de hojas de *Spathodea campanulata*
- Evaluar capacidad hipoglucemiante y antioxidante de las flores de *Spathodea campanulata*
- Cuantificar las neuronas íntegras y lesionadas, en otras regiones del cuerno de Ammon y otras estructuras cerebrales
- Evaluar grupos de estudio equiparables, con pruebas cognoscitivas en el laberinto acuático de Morris

X. Referencias

- Acosta, A., Frías de León, M. G., Reyes, M. R., Vargas, H. V., Suárez Cuenca, J. A. 2011. Radicales libres y mecanismos de daño tisular en la diabetes mellitus. *Rev. Fac. Med. (Méx.)*. 54(3), 46-53.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). 2011. Evaluación Nutricional de la Dieta Española I. Energía y Macronutrientes sobre datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE) http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/valoracion_nutricional_enide_macronutrientes.pdf
- Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Romo-Yáñez, J., Camarillo-Ledesma, P., Gómez-Sánchez, M., & Salazar-Olivo, L. A. 2010. The antidiabetic plants *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) and *Teucrium cubense* Jacq (Lamiaceae) induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes. *J Ethnopharmacol.* 127(1): 1-6.
- Alberto, R., Sanz, A., y Playán, J. 2004. Metabolismo en el ayuno. *Endocrinol Nutr.* 51 (4): 139–148.
- Álvarez Seijas, E., González Calero, T. M., Cabrera Rode, E., Conesa González, A. I., Parlá Sardiñas, J., & González Polanco, E. A. 2009. Algunos aspectos de actualidad sobre la hemoglobina glucosilada y sus aplicaciones. *Rev Cubana Endocrinol.* 20(3): 141-151.
- American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 37(1): 81-90 [a].
- American Diabetes Association. 2014. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care.* 37(1): 14-80 [b].
- Andrade-Cetto, A., 2012. Effects of medicinal plant extracts on gluconeogenesis. *Botanics: Targets and Therapy.* 2: 1-6.

- Ávalos, G. y Pérez, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119-145.
- Barraza, L., Guajardo, V., Picó, J., García, R., Hernández, C., Mora, F., Athié, J., Crable, E., Urtiz, A. 2015. Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013. Primera edición. México, D.F.: *Funsalud*. 1-131.
- Bandeira, S. M., da Fonseca, L. J., da S Guedes, G., Rabelo, L. A., Goulart, M. O., & Vasconcelos, S. M. 2013. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 14(2): 3265-84.
- Biessels, G., Kamal, A., Ramakers, G., Urban, I., Spruijt, M., Erkelens, W., Hendrik, W. 1996. Place Learning and Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetes*. 45(9): 1259 – 1266.
- Borrelli, G. M. & Trono, D. 2016. Molecular Approaches to Genetically Improve the Accumulation of Health-Promoting Secondary Metabolites in Staple Crops—A Case Study: The Lipoxygenase-B1 Genes and Regulation of the Carotenoid Content in Pasta Products. *Int J Mol Sci*. 17 (7): 1177.
- Bornstein, N., Brainin, M., Guekht, A., Skoog, I., Korczyn, A. 2014. Diabetes and the brain: issues and unmet needs. *Neurol. Sci*. 35(7): 995–1001.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss & Technol*, 28 (1): 25-30.
- Calvo, O. & Arias C. 2015. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signaling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease. Animal models of study. *Diabetes Metab Res Rev*. 31(1): 1-13.
- Calani, L., Dall'Asta, M., Derlindati, E., Scazzina, F., Bruni, R., Del Rio, D. 2012. Colonic of polyphenols from coffee, green tea and hazelnut skins. *J Clin Gastroenterol*. 46 (1); 95-99.

- Cervantes, M., Ibarra, A., González, D. 2006. Prevalencia de neuropatía periférica en diabetes mellitus. *Acta Médica Grupo Ángeles*. 4(1): 13-17.
- Cisternas, P., Salazar, P., Serrano, F. G., Montecinos-Oliva, C., Arredondo, S. B., Varela-Nallar, L., Barja, S., Vio, C. P., Gomez-Pinilla, F., Inestrosa, N. C. 2015. Fructose consumption reduces hippocampal synaptic plasticity underlying cognitive performance. *Biochim Biophys Acta*. 1852 (11): 2379-90.
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J.P., Cros, G., Azay J. 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis*. 179(1): 43-49.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 40(3): 173–289.
- Díaz, M., Baiza, L. A, Ibáñez, M.A., Pascoe, D., Guzmán, A. M., Kumate, J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Méd Méx*. 140(4): 437-448.
- Dupas, J., Goanvec, C., Feray, A., Guernec, A., Alain, C., Guerrero, F., Mansourati, J. 2016. Progressive Induction of Type 2 Diabetes: Effects of a Reality–Like Fructose Enriched Diet in Young Wistar Rats. *PLoS ONE*. 11(1): 1-13.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bahramian, F., Bekhradnia, A. R. 2010. Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. Var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci*. 23(1): 29-34.
- Esquivel, E. R., Noriega, R., Bello, M. A., Saavedra, A., Salgado, R. 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*. 14(1): 45-52.

- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23(5):599-622.
- Farkas, E., Luiten, P. y Bari, F. 2007. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* 54 (1): 162-180.
- Farzaei, M. H., Shahpiri, Z., Mehri M, R., Bahramsoltani, R., Rezaei, M., Raeesdana, A., Rahimi, R. 2018. Medicinal Plants in Neurodegenerative Diseases: Perspective of Traditional Persian Medicine. *Curr Drug Metab.* 19(5):429-442
- Fenton-Navarro, B., Urquiza Martínez, M. V., Fiscal Castro, B. B., Medrano Castillo, O.I., López-Rodríguez, M., Padilla Arellanes, S., Vázquez Hernández, A. Antioxidant And Hypoglycemic Effects Of Watercress (*Nasturtium Officinale*) Extracts In Diabetic Rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 15 (2): 68-79.
- Figuroa-García, M. C., Rivera-Valencia, M., Sosa-Durán, E. E., Saavedra-Molina, F. A., Mejía-Zepeda, R. 2016. Perfil glicémico durante el ayuno en ratas macho-Wistar con diabetes tipo 2. *Rev Hosp Jua Mex.* 83(1-2): 23-30.
- Gemert, T., Wölwer, W., Weber, K., Hoyer, A., Strassburger, K., Bohnau, N., Brüggem, M., Ovelgönne, K., Gössmann, E., Burkart, V., Szendroedi, J., Roden, M., Müssig, K. y GDS, Group. 2018. Cognitive Function Is Impaired in Patients with Recently Diagnosed Type 2 Diabetes, but Not Type 1 Diabetes. *J Diabetes Res.* 67(1), 822-832.
- Gold, S. M., Dziobek, I., Sweat, V., Tirsi, A., Rogers, K., Bruehl, H., Tsui, W., Richardson, S., Convit A. 2007. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 50(4): 711–719.
- Golalipour, M. J., Jahanshahi, M., Ghafari, S., Afshar, M. 2013. The Preventive and Treatment Effect of *Urtica dioica* on Astrocyte Density in the CA1 and CA3

- Subfields of Hippocampus in STZ Induced Diabetic Rats. *Int. J. Morphol.* 31(2): 693-699.
- Gutiérrez J.P., Rivera J, Shamah T, Oropeza C, Hernández M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa, Michoacán. *Instituto Nacional de Salud Pública.* 1-112.
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 11(4), 1365-402.
- Hayashi, K., Kurioka, S., Yamaguchi, T., Morita, M., Kanazawa, I., Takase, H., Wada, A., Kitagaki, H., Nagai, A., Bokura, H., Yamaguchi, S. y Sugimoto, T. 2011. Association of cognitive dysfunction with hippocampal atrophy in elderly Japanese people with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 94 (2), 180-185.
- Hernán. 2013. Técnicas de tinción del Sistema Nervioso. Recuperado de <http://medicina-uba.blogspot.mx/2009/05/tecnicas-de-tincion-del-sistema.html>
- Hernández, M., Rivera, J., Shamah T., Cuevas, T., Gómez Acosta, L. M. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016: Informe final de resultados. *Instituto Nacional de Salud Pública.* 1-149.
- Hoda, M., Hemaiswarya, S., & Doble, M. 2019. Role of Phenolic Phytochemicals in Diabetes Management. *Springer.* 1-193
- Hsu, T. M., Konanur, V., Taing, L., Usui, R., Kayse, B., Goran, M., Kanoski, S. 2015. Effects of Sucrose and High Fructose Corn Syrup Consumption on Spatial Memory Function and Hippocampal Neuroinflammation in Adolescent Rats. *Hippocampus.* 25 (2): 227-239.
- Ilodigwe, E. E., Akah, P. A., Nworu, S. C. 2010. Anticonvulsant Activity of Ethanol Leaf Extract of *Spathodea campanulata* P. Beauv (Bignoniaceae). *J Med Food.* 13 (4): 827-833.

- International Diabetes Federation, 2017. Atlas de Diabetes. 8va edición. ISBN: 978-2-930229-87-4.
- Jing, Y. H., Chen, K. H., Kuo, P. C., Pao, C. C., Chen, J. K. 2013. Neurodegeneration in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats is Attenuated by Treatment with Resveratrol. *Neuroendocrinology*. 98:116-127.
- John, K. F. 1990. *Spathodea campanulata* Beauv. African tulip tree. *SO-ITF-SM-32*. 1-5.
- Kishore P. 2017. Manual MSD. Merck and Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA. Recuperado de <http://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-endocrinos-y-metab%C3%B3licos/diabetes-mellitus-y-trastornos-del-metabolismo-de-los-hidratos-de-carbono/diabetes-mellitus-dm>
- Kim, D., Weon J. S., Lee, C. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 81 (3): 321-326.
- Kim, Y., Keogh, B. J. and Clifton M. P. 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 8 (1): 17.
- Laguna, G., Río, C. A., Meneses, I. G., Brechú A. E. 2017. Histochemistry and immunolocalisation of glucokinin in antidiabetic plants used in traditional Mexican medicine. *Eur J Histochem*. 61 (2): 125-143.
- Larsen, M. L., Hørder, M., Mogensen, E. F. 1990. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 323(15): 1021-5.
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J. and Lombó, F. 2015. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomed Res Int*. (15): 18
- Makinde, M., Adesoga, E. K., Amusan, O. O. G. 1987. The schizontocidal activity of *Spathodea campanulata* leaf extract on *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Phytother Res*. 1(2): 65- 68.

- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 17 (6): 271-278.
- Martínez, J., Boll-Woehrlen, M. C., Hernández-Melesio, P. M., Rubio-Osornio, M., Sánchez- Mendoza, M. A., Ríos C., Pérez Severiano, F. 2010. Radicales Libres y Estrés Oxidativo en las Enfermedades Neurodegenerativas. *Mensaje Bioquímico.* 34: 43-59.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 81: 230– 242.
- Mijnhout, G., Scheltens, P., Diamant, M., Biessels, G. J., Wessels, A. M., Simsek, S., Snoek, F. J., Heine, R. J. 2006. Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia.* 49(6): 1447–1448.
- Mohammad Hosein Farzaei, Zahra Shahpiri, Mohammad Reza Mehri, Roodabeh Bahramsoltani, Mahdi Rezaei, Azade Raeesdana, Roja Rahimi. 2018. *Curr Drug Metab.* 19 (5): 429 – 442.
- Mohamed, Z. M. S., Yousry, M. G., Nader A. E. S. and Salem, A. Z. M. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tacoma Stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (5): 418-426.
- Mozaffarian, D. and Wu, J. 2018. Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health: A Review of Emerging Biologic Pathways. *Cir Res.* 122 (2): 369–384.
- National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>

- Navarro-González, I., Periago, M. J., y García Alonso, F. J. 2017. Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *J. Hum. Nutr. Diet.* 21(4): 320-326.
- Niyonzima, G., Laekernan G., Witvrouw M., Van Poel B., Pieters L., Pape D., De Clercq E., Franz G., Vlierinck AJ., 1999. Hypoglycemic, anticomplement and anti-HIV activities of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytomedicine.* 6 (1): 45-49
- NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- OECD. 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure.
- Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles. OMENT. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2018. Recuperado de: <http://oment.uanl.mx/>.
- Olivares J., Juárez E. García F. 2015. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana.* 15(1): 20-28.
- Olmos, P. R., Niklitschek, S., Olmos, R. I., Faúndez, J. I., Quezada, T. A., Bozinovic, M. A., Niklitschek, I. A., Acosta, J., Valencia, C. N., y Bravo, F. A. (2012). Bases fisiopatológicas para una clasificación de la neuropatía diabética. *Rev Méd Chile.* 140(12): 1593-1605.
- Orozco Montes F, Vázquez-Hernández, A., Fenton-Navarro, B. 2019. Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects. *Phyton.* 88: 1-10
- Ovaskainen, M.L., Torronen, R., Koponen, J.M., Sinkko, H., Hellstrom, J., Reinivuo, H., Mattila, P. 2008. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr.* 138, 562–566.

- Patel, D. K., Prasad, S. K., Kumar, R., Hemalatha, S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(4): 320-330.
- Patel D. K., Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. 2012. Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(5): 411-420.
- Paxinos G y Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. Elsevier, 2009.
- Pereira, R. M., Botezelli, J. D., da Cruz Rodrigues, K. C., Mekary, R. A., Cintra, D. E., Pauli, J. R., da Silva, A. S. R., Ropelle, E. R., de Moura, L. P. 2017. Fructose Consumption in the Development of Obesity and the Effects of Different Protocols of Physical Exercise on the Hepatic Metabolism. *Nutrients.* 9 (4): 405
- Pereira-Despaigne, O. L., Palay-Despaigne, M. S., Rodríguez-Cascaret, A., Neyra-Barros, R. M., & Chia-Mena, M. A. 2015. Hemoglobina glucosilada en pacientes con diabetes mellitus. *MEDISAN.* 19(4), 555-561.
- Pérez, J. J., Saura, C. F. 2007. Metodología Para La Evaluación De Capacidad Antioxidante En Frutas Y Hortalizas. V Congreso Iberoamericano De Tecnología Postcosecha Y Agroexportaciones. Recuperado de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/71/429/71429.pdf>.
- Piotrowski, P., Wierzbicka, K., Smialek, M. 2001. Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants. *Folia Neuropathol.* 39 (3): 147–154.
- Ramamoorthy, P. K., and Bono, A. 2007. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content of Morinda Citrifolia Fruit Extracts from Various Extraction Processes. *JESTECH.* 2 (1): 70 – 80.
- Rana, A., Bhangalia, S., Pratap S. H. 2013. A new phenylethanoid glucoside from Jacaranda mimosifolia. *Nat. Prod. Res.* 27 (13): 1167-1173.

- Rivero, R. A., Betancort Rodríguez J.R. 2006. Evaluación De La Actividad Antioxidante De Polifenoles De Algas Marinas. *ResearchGate*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/237330780>.
- Rojas, M. R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C. A., Zárte-Rojas, E., Villalpando, S., Barrientos-Gutiérrez, T. 2017. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Pública de México*. 60: 1-9.
- Ross, A. P., Bartness, T. J., Mielke, J. G., Parent, M. B. 2009. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92 (3): 410-416.
- Sattanathan, S., Dhanapal, C. K., Umarani, R., Manavalan, R. 2011. Beneficial health effects of rutin supplementation in patients with diabetes mellitus. *J. Appl. Pharm. Sci.* 1 (8): 227-231.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. 1997. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76: 270-276.
- Shah, A. P., 2019. Manual MSD. Merck and Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA. Recuperado: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-urogenitales/abordaje-del-paciente-con-trastornos-urogenitales/evaluaci%C3%B3n-del-paciente-renal#resourcesInArticle>
- Shivashankara, K. S. and Acharya, S. N. 2010. Bioavailability of Dietary Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. *The Open Nutraceuticals J.* 3: 227-241
- Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R., Egan, J. M., & Mattson, M. P. 2008. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, 18(11): 1085–1088.
- Sandoval-Ávila, S., Díaz, N. F., Gómez-Pinedo, U., Canales-Aguirre, A. A., Gutiérrez-Mercado, Y.K., Padilla-Camberos, E., Márquez-Aguirre, A. L., Díaz-Martínez, N.E. 2019. Efecto neuroprotector de fitoquímicos en cultivo de neuronas dopaminérgicas. *Neurología*. 34(2); 114-124.

- Tran, L. T., Yuen, V. G., McNeill, J. H. 2009. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 332 (2): 145-159.
- Vademécum. 2016. Monografías Principio Activo. Recuperado: <https://www.vademecum.es/principios-activos-metformina-a10ba02>
- Wians, F. H., 2019. Manual MSD. Merck and Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA. Recuperado: <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/ap%C3%A9ndices/valores-normales-de-laboratorio/an%C3%A1lisis-de-orina-valores-normales>
- Xiao, J. B. and Högger, P. 2015. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Curr. Medicina. Chem.* 22 (1): 23-38
- Yang, D. K. and Kang, H. 2018. Anti-Diabetic Effect of Cotreatment with Quercetin and Resveratrol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biomol Ther.* 26(2): 130-138
- Zhang, Y., Zhang, J.-Q., Liu, C., Wei, P., Zhang, X., Yuan, Q.-Y. Wang, J. 2015. Memory dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus correlates with reduced hippocampal CA1 and Subiculum volumes. *Chin Med J.* 128 (4): 465-471.
- Zhao, F., Li, J., Mo, L., Tan, M., Ting, Z., Tang Y, Zhao Y. 2016. Changes in Neurons and Synapses in Hippocampus of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Rats: A Stereological Investigation. *Anat Rec (Hoboken).* 299 (9): 1174-1183.

XI. Anexos

Anexo 1



Universidad Nacional
Autónoma de México



HERBARIO NACIONAL DE MÉXICO
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

14 de octubre de 2018.

Dra. Bertha Fenton Navarro
Laboratorio de Glicobiología
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
PRESENTE:

Hago de su conocimiento la verificación taxonómica realizada por la M. en C. Verónica Juárez Jaimes, del material recolectado por Bertha Fenton "Galeana", en Calzada Ventura Puente #27 Col. Cuauhtémoc en Morelia, Michoacán, el 30 de julio del año en curso; así mismo le estoy proporcionando el número de folio asignado al ejemplar en el Herbario Nacional MEXU.

"Galeana": familia Bignoniaceae, especie *Spathodea campanulata* P. Beauv., con el número de folio en MEXU 1489469.

Cabe señalar que la verificación es válida solamente para el ejemplar referido, solicitud OD11092018.

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente,

M. en C. Verónica Juárez Jaimes
Programa de determinación