



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO

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

TESIS:

**Efecto Neuroprotector de la administración crónica de
Galeana (*Sphatodea campanulata*) en el hipocampo de
ratas con diabetes mellitus 2**

**Que como requisito parcial para obtener
el título profesional de:**

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:
LIC. EN BIOTECNOLOGÍA

Raziel Alejandro Arias Sánchez

**DIRECTORA DE TESIS:
D.C. BERTHA FENTON NAVARRO**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:
D.C. MARIA DE LA LUZ TORNER AGUILAR**



Morelia, Michoacán, Mayo de 2023

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).

El 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 por la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias de la Salud.

Registro de becario: 2142288

CVU: 1104996

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:

Licenciado en Biotecnología

Raziel Alejandro Arias Sánchez

D. C. José Miguel Cervantes Alfaro

D. C. Martha Eva Viveros Sandoval

D. C. Graciela Ma. Eugenia Letechipía Vallejo

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 la **D. C. Bertha Fenton Navarro**

Apoyos:

- **CIC-UMSNH-BFN-2021, 2022-2023.**
- **PICIR-029-BFN**

Laboratorio de Neuroendocrinología

Centro de Investigación Biomédica de Michoacán

IMSS Michoacán

A cargo de la **D. C. Luz Torner Aguilar**

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

La familia la podemos definir como el grupo de personas que más que unidas por papeles y cláusulas, están unidas por el irrompible vínculo del amor, la familia no necesariamente es un padre y una madre mediante el proceso de crianza de un hijo, la familia es el vínculo mismo del amor, es el momento exacto en que las palabras dejan de ser solo palabras para convertirse en actos, en hechos y momentos de entrega y compromiso, eso es familia.

Por lo que dedico este trabajo y agradezco a mi familia, a mi papá Ariel, a mi mamá Isabel, a mis hermanos Adrián y Darío por apoyarme en cada decisión y proyecto, gracias a la vida porque cada día me demuestra lo hermosa que es la vida y lo justa que puede llegar a ser; gracias a mi familia por permitirme cumplir con excelencia en el desarrollo de esta tesis. Gracias por creer en mí y gracias a Dios por permitirme vivir y disfrutar de cada día. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco, y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, mi hermosa familia.

A mis amigos de la maestría y del laboratorio que estuvieron acompañándome durante esta etapa donde cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfruté mucho, y no fue porque simplemente me dispuse a que así fuera, fue porque mis amigos siempre estuvieron ahí. Además de disfrutar las actividades fuera de la escuela con su compañía y amistad. También agradecer a mi mejor amiga y novia Flor por todo su apoyo y amor que siempre me brinda.

También agradezco a mis asesoras la doctora Bertha Fenton y a la doctora Luz Torner por aceptarme y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, además de darme la confianza y enseñanzas ya que gracias a ellas he obtenido un inmenso aprendizaje, así como haberme podido desarrollar profesional y personalmente causando en mí gran satisfacción.

En la vida hay momentos, buenos y malos pero son momentos y hay que vivirlos

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
II.1 Prevalencia de la diabetes mellitus.....	3
II.1.1 Definición de la diabetes mellitus	3
II.1.1.1 Diagnóstico y fármacos para el tratamiento de Diabetes Mellitus	8
II.1.2 Tipos de diabetes mellitus.....	10
II.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1.....	11
II.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2.....	11
II.1.2.3 Diabetes mellitus gestacional.....	14
II.1.3 Complicaciones de la diabetes mellitus	15
II.1.3.1 Complicaciones macrovasculares.....	15
II.1.3.2 Complicaciones microvasculares.....	16
II.1.4 Mecanismos de daño tisular presentes en la diabetes mellitus.....	17
II.1.4.1 Vía del sorbitol.....	17
II.1.4.2 Acción de productos de glicación avanzada.....	19
II.1.4.3 Vía de la proteína- cinasa C.....	20
II.1.5 Complicaciones de la diabetes en el sistema nervioso central.....	21
II.1.5.1 Alteración de la memoria y demencia.....	24
II.1.5.2 Deterioro cognitivo y alteraciones del aprendizaje.....	26
II.1.5.3 Pérdida encefálica.....	29
II.1.6. Descripción del hipocampo.....	30
II.1.6.1 Cambios morfológicos del hipocampo en diabetes mellitus.....	35
II.1.7. Polifenoles: síntesis, absorción y efecto en el metabolismo de glucosa en la enfermedad de DM.....	36
II.1.8 Las plantas medicinales. Efectos neuroprotectores y antioxidantes.....	41
II.1.8.1 Metabolitos secundarios y mecanismos de acción.....	47
II.1.9 Galeana (<i>Spathodea campanulata</i>). Descripción, clasificación taxonómica, componentes y usos en la medicina tradicional.	49
III. JUSTIFICACIÓN	52
IV. HIPÓTESIS	53

V. OBJETIVO GENERAL.....	53
V.1 Objetivos Particulares.....	53
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	54
VII.MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
VII.1 Material.....	55
VII.2 Métodos.....	55
VII.3 Análisis Estadístico.....	61
VIII. RESULTADOS.....	62
VIII.1 Efecto hipoglucemiante de <i>S. campanulata</i>	62
VIII.2 Pruebas de conducta	64
VIII.3 Peso corporal y cerebral.....	67
VIII.4 Inmunohistoquímica de precursores neurales con BrdU.....	70
VIII.5 Inmunohistoquímica de precursores neurales con DCX.....	72
IX. DISCUSIÓN.....	74
X. CONCLUSIONES.....	94
XI. PERSPECTIVAS.....	95
XII. REFERENCIAS.....	96
XIII. ANEXOS.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

No.		Pág.
1	Insulina como regulador de la entrada de glucosa a la célula	7
2	Representación esquemática de una célula beta (β)	8
3	Los ocho mecanismos principales que contribuyen a hiperglucemia en pacientes con DM2	13
4	Fisiopatología de la hiperglucemia en DM2	14
5	Vías metabólicas de la glucosa en condiciones euglucémicas e hiperglucémicas	18
6	Secuencia simplificada de la glicación de proteínas mediada por glucosa y fructosa	20
7	Efectos fisiológicos y mecanismos celulares de la hiperglucemia inducida por la activación de DAG-PKC	21
8	Patogenia de las neuropatías diabéticas	24
9	Mecanismo de aumento de estrés oxidativo que impulsa la resistencia a la insulina en el cerebro con DM	26
10	Numerosos mediadores potenciales del deterioro cognitivo en pacientes con DM	27
11	Trayectorias de anomalías en la resonancia magnética cerebral en pacientes con DM2	30
12	Anatomía del hipocampo	31
13	Incorporación de neurogénesis de neuronas del Giro dentado (DG)	33
14	Síntesis, clasificación y efectos en la salud de los polifenoles	37
15	Representación esquemática de la formación de precursores de los compuestos secundarios a través de la vía del Shikimato	38
16	Sitios potenciales de acción de los polifenoles dietéticos sobre el metabolismo de los carbohidratos y la homeostasis de la glucosa.	41
17	Principales vías de señalización del efecto neuroprotector de polifenoles	45
18	Otros efectos neuroprotectores brindados por polifenoles	46
19	Descripción esquemática de los mecanismos protectores de polifenoles contra las vías intracelulares responsables de las complicaciones diabéticas	47
20	<i>Spathodea campanulata</i> (Galeana)	50
21	Hojas y Flores de <i>S. campanulata</i>	50
22	Glucosa sanguínea en ratas diabéticas administradas con los diferentes tratamientos	62
23	Hemoglobina glicosilada al comienzo y final de los tratamientos	64
24	Prueba de laberinto en cruz elevado	65

25	Prueba de reconocimiento de objetos novedosos	66
26	Prueba de reconocimiento espacial	67
27	Peso corporal de ratas diabéticas administradas con los diferentes tratamientos	68
28	Peso cerebral de ratas macho diabéticas con los diferentes tratamientos	68
29	Volumen cerebral de ratas macho diabéticas con los diferentes tratamientos	69
30	Número de precursores neurales BrdU ⁺ en el giro dentado	71
31	Número de neuronas inmaduras en el giro dentado	73

ÍNDICE DE TABLAS

No.		Pág.
1	Actividades, ventajas y desventajas de las principales clases convencionales de medicamentos farmacológicos para la DM	10
2	Resumen de las funciones cognitivas que se encuentran afectadas en la DM1 y DM2	28
3	Reducción en la concentración de glucosa y porcentaje de área bajo la curva de las concentraciones de glucosa con los diferentes tratamientos	63

Abreviaturas

ABC: ATP-Binding-Cassette	DM2: Diabetes mellitus tipo 2
ACoA: AcetilCoA	DMG: Diabetes mellitus gestacional
ADP: Adenosina diifosfato	EA: Enfermedad del Alzheimer
AGE: Productos finales de glicación avanzada	EASC: Extracto acuoso de <i>Spathodea campanulata</i>
AKT: Proteína cinasa B	EC: Corteza entorrinal
AMP: Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina	ECM: Moléculas de la matriz extracelular
AR: Aldosa reductasa	ECV: Enfermedad cardiovascular acelerada
ATP: Adenosina trifosfato	EE: Error estándar
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro	EGO: Prueba de orina general
BHE: Barrera Hematoencefálica	EPMT: Prueba de laberinto en cruz elevado
BrdU: bromodesoxiuridina	ERK: Cinasa regulada por señal extracelular
CA: Cornu Ammonis	GD: Giro Dentado
CaMKs: Proteínas quinasas dependientes de Ca ²⁺ /calmodulina	GK: Glucocinasa
CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad	GLUT: Transportadores de glucosa
CRE: Elementos de respuesta de AMP cíclico	HbA1c: Hemoglobina glicosilada
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta cAMP	HLA: Antígeno leucocitario humano
DAG: Diacilglicerol	HPA: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
DCL: Disfunción cognitiva leve	IL: Interleucina
DCX: Doble cortina	IRS: Receptor de Insulina
DI: Índice de discriminación	LCR: Líquido cefalorraquídeo
DM: Diabetes mellitus	MAPK: Cinasas activadas por mitógeno
DM1: Diabetes mellitus tipo 1	MC: células musgosas hiliares
	MF: Metformina

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico

ND: Neuropatía Diabética

NF- κ B: factor nuclear kappa B

NMDA: Receptores de glutamato de N-metil-D-aspartato

NORT: Prueba de reconocimiento de objetos

NPD: Neuropatía periférica diabética

NSC: Células madre/progenitoras neurales multipotentes

PB: Buffer de fosfatos

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Fosfatidil Inositol 3 Kinasa

PKC: Activación de isoformas de proteína quinasa C

PPAR γ : Activador a través del proliferador de peroxisoma

RAGE: Receptor de AGE

RD: Retinopatía diabética

RE: Retículo endoplásmico

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

S. campanulata: *Sphatodea campanulata*

SB: Subículo

SGLT1: Transportador activo de glucosa dependiente de sodio

SGZ: Zona subgranular

SNC: Sistema nervioso central

SOG: Sobrecarga Oral de Glucosa

SRT: Prueba de reconocimiento espacial

STZ: Estreptozotocina

SUR: Receptor de sulfonilurea

SVD: Marcadores de enfermedad de vasos pequeños

SVZ: Zona subventricular

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TrkB: Receptor de proteína transmembrana tropomiosina quinasa B

VCN: Velocidades de conducción nerviosa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

α -glu: α -glucosidasa

Resumen

La diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones forman parte de las enfermedades crónico degenerativas que constituyen un problema sanitario mundial. La DM tipo 2 (DM2), causada por la deficiencia y la resistencia de insulina en el organismo, eleva la glucosa a concentraciones perjudiciales con un pronóstico terminal si no se controla. El deterioro cognitivo está reconocido como una complicación de la DM. La DM provoca una reducción celular y un aumento de la muerte neuronal en el hipocampo, con el consiguiente deterioro de la memoria y el aprendizaje. Los fármacos comerciales para el tratamiento de la diabetes, incluida la metformina, tienen un control glucémico razonable, pero también pueden causar efectos secundarios adversos. Por ello, se buscan alternativas de apoyo para el tratamiento de los pacientes, como las plantas medicinales, entre las que se encuentra *S. campanulata*, perteneciente a la familia Bignoniaceae y conocida como Galeana en México. Por lo que dentro de este estudio se tuvo como objetivo evaluar el efecto neuroprotector en el giro dentado (GD) tras la administración oral de extracto de hojas de *S. campanulata* en ratas con DM2. Se recolectaron hojas de Galeana para obtener el extracto acuoso de la planta (EASC). Se indujo DM2 a ratas Wistar con administración de fructosa al 60% durante 6 semanas, se les administró de manera oral crónica (9 semanas) el extracto acuoso de Galeana (EASC) mediante una sonda de alimentación a ratas diabéticas de 200g. Los grupos de ratas fueron control sano, control diabético sin tratamiento (DM2), control diabético tratado con metformina (DM+MF) y ratas diabéticas tratadas con el extracto (DM+EASC), con 8 ratas por grupo. Posteriormente, se evaluó la glucemia, el % HbA1c, el peso y volumen cerebrales, y se realizaron pruebas conductuales del laberinto elevado en cruz y la prueba de reconocimiento de objetos nuevos para evaluar la ansiedad y la memoria no espacial, así como el reconocimiento espacial en los animales. También se realizó el recuento de precursores neurales y neuronas en el GD. Obteniendo como resultados que durante las 9 semanas de administración del EASC a ratas diabéticas, se observaron concentraciones <100 mg/dL de glucemia, confirmando su efecto hipoglucemiante. Se observó una inhibición de la reducción del peso y volumen cerebral en las ratas DM+EASC. Los resultados de las pruebas de comportamiento, así como el recuento de precursores neurales y neuronas, se vieron aumentados en las ratas DM+EASC respecto a las ratas DM2, además no se mostraron diferencias significativas entre los grupos de ratas sanas en comparación con las ratas DM+ EASC. Por lo que se concluye que la administración del EASC produce un efecto hipoglucemiante y neuroprotector en las neuronas del GD y reducciones cerebrales, así como, sobre la memoria y el aprendizaje mediado por el hipocampo de ratas diabéticas tratadas con el extracto.

Palabras clave: *Spathodea campanulata*, diabetes mellitus, neuroprotector, polifenoles, neurogénesis.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) and its complications are among the chronic degenerative diseases that constitute a global health problem. Type 2 DM (DM2), caused by insulin deficiency and resistance in the body, raises glucose to harmful concentrations with a terminal prognosis if uncontrolled. In addition, cognitive impairment is recognized as a complication of DM. DM causes cellular depletion and increased neuronal death in the hippocampus, impairing memory and learning. Commercial drugs for treating diabetes, including metformin, have reasonable glycemic control but can also cause adverse side effects. For this reason, support alternatives are sought for treating patients, such as medicinal plants, including *S. campanulata*, belonging to the Bignoniaceae family and known as Galeana in Mexico. Therefore, this study aimed to evaluate the neuroprotective effect on the dentate gyrus (DG) after oral administration of *S. campanulata* leaf extract in rats with DM2. Galeana leaves were collected to obtain the aqueous extract of the plant (EASC). DM2 was induced in Wistar rats with 60% fructose administration for 6 weeks, and the aqueous extract of Galeana (EASC) was administered chronically orally (9 weeks) through a feeding tube to 200g diabetic rats. The groups of rats were healthy control, diabetic control without treatment (DM2), diabetic control treated with metformin (DM+MF), and diabetic rats treated with the extract (DM+EASC), with 8 rats per group. Subsequently, glycemia, % HbA1c, brain weight, and volume were evaluated. Behavioral tests of the elevated cross maze and the novel object recognition test were performed to assess anxiety, non-spatial memory, and spatial recognition in the animals. Neural precursor and neuron counts were also performed in the DG. Results showed that during the 9 weeks of administration of EASC to diabetic rats, concentrations <100 mg/dL of glycemia were observed, confirming its hypoglycemic effect. In addition, inhibition of brain weight and volume reduction was observed in DM+EASC rats. The results of the behavioral tests, as well as the neural precursor and neuron counts, were increased in the DM+EASC rats with respect to the DM2 rats; moreover, no significant differences were shown between the groups of healthy rats compared to the DM+ EASC rats. Therefore, it is concluded that the administration of EASC produces a hypoglycemic and neuroprotective effect on DG neurons and brain reductions, as well as on memory and learning mediated by the hippocampus of diabetic rats treated with the extract.

Key words: *Spathodea campanulata*, diabetes mellitus, neuroprotective, polyphenols, neurogenesis.

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que, a nivel mundial, de 1995 al año 2013 se triplicó el número de personas con diabetes, con cifra actual estimada en más de 422 millones de personas con diabetes (OMS, 2022). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Pakistan, Estados Unidos, Brasil y México, son (en ese orden) los países con mayor número de diabéticos (FID, 2021). La diabetes y sus complicaciones son parte del grupo de enfermedades crónico degenerativas, que constituyen un problema de salud a nivel mundial. La diabetes es una importante causa de ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y amputación de los miembros inferiores. Esta enfermedad crónica aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Durante la diabetes mellitus, la glucemia se eleva a valores anormales hasta alcanzar concentraciones nocivas para los sistemas fisiológicos, provocando daño en el tejido nervioso (neuropatías), alteraciones en la retina (retinopatía), el riñón (nefropatía) y en prácticamente el organismo completo, con un pronóstico letal si no se controla (Cervantes y Presno, 2013).

El deterioro cognitivo, se reconoce cada vez más como una posible complicación de la diabetes (Luchsinger *et al.*, 2018). El hipocampo es una estructura cerebral vulnerable a los efectos de la diabetes, ya que la hiperglucemia puede inducir daño oxidativo al aumentar la producción de radicales libres y reducir los mecanismos de defensa antioxidantes (Rababa'h *et al.*, 2019). Cualquier factor que altere el equilibrio entre la proliferación/muerte neuronal (como la diabetes) puede resultar en un deterioro de la memoria y el aprendizaje. Los estudios han demostrado que la diabetes experimental causa una disminución de las células granulares, proliferación y muerte neuronal (necrosis/apoptosis) en CA1-CA3 y regiones de giro dentado (Piotrowski *et al.*, 2001; Golalipour *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Sadeghi *et al.*, 2016).

Hay varios medicamentos comerciales disponibles para el tratamiento o el control de la diabetes, entre los que se encuentran las biguanidas, dentro de las que se encuentra la metformina. Pero se ha descubierto que el uso de estos tratamientos farmacológicos puede traer como consecuencia efectos secundarios adversos para los pacientes (Chukwuma *et al.*, 2019).

El uso de la medicina tradicional y complementaria se está expandiendo rápidamente en todo el mundo y muchas personas recurren a las plantas para el tratamiento de diversos problemas de salud (Sen y Chakraborty, 2017). Se ha descubierto que las moléculas derivadas de plantas poseen compuestos terapéuticos potenciales capaces de mejorar y tratar varias enfermedades, entre ellas la diabetes (Ekor, 2014). La especie *Spathodea campanulata* originaria de África (Franco *et al.*, 2015), es conocida en la medicina tradicional africana por su eficacia hipoglucemiante en el tratamiento de la diabetes (Teinkela *et al.*, 2016). Recientemente dentro de nuestro grupo de trabajo se encontró que los extractos de hojas de *S. campanulata* presentaron un efecto hipoglucemiante y neuroprotector en la administración oral a ratas diabéticas, además de un posible efecto antioxidante (Escamilla, 2019).

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Prevalencia de la diabetes mellitus

Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con DM se reduce entre 5 y 10 años. En México, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2013 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años de vida (Hernández *et al.*, 2013). El desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico y la pérdida de calidad de vida para quienes padecen diabetes y sus familias, así como por los importantes recursos que requiere el sistema público de salud para la atención de esta enfermedad. Estimaciones indican que en México los costos de atención por paciente son cerca de los 1,415 dólares anuales, lo que se traduce en 9 a 14% del gasto en salud destinado a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones, inversión que de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes se relaciona directamente con la tasa de mortalidad por esta causa.

La prevalencia de la DM se ha incrementado en las últimas décadas: en 2007 la prevalencia de diabéticos con diagnóstico conocido en población mayor de 20 años fue de 7% (Romero *et al.*, 2013), mientras que en 2023, la Secretaría de Salud reportó una prevalencia del 11.9% (51.96% en mujeres y 48.03% en hombres), es decir cerca de 85, 361,125 personas en el país con DM. En relación con la mortalidad en México, el INEGI estimó que, en 2022, la diabetes fue la segunda causa de muerte en el país con 119, 992 fallecimientos.

II.1.1 Definición de la diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica y/o un desorden metabólico de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla o insuficiencia renal, accidente cerebrovascular, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (Diabetes U.K., 2010). Los síntomas clásicos de la DM son poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y prurito o escozor por infecciones micóticas (Herrera *et al.*, 2012). La dieta saludable, la actividad física regular, un peso corporal normal, evitar el consumo de tabaco, así como realizarse exámenes médicos periódicos pueden prevenir o retrasar la aparición de DM, además de tener la posibilidad de detectar y tratar la enfermedad de forma temprana (OMS, 2022). Los estilos de vida poco saludables son altamente prevalentes entre niños, adolescentes y adultos mexicanos, propiciando un aumento importante de obesidad, principal factor de riesgo modificable de la DM (Hernández *et al.*, 2013).

La DM aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (defectos en la secreción y/o acción de la insulina), causada por una alteración en la función endocrina del páncreas o por la alteración de la pérdida de sensibilidad en los tejidos efectores que son incapaces de utilizar a la insulina correctamente, provocando concentraciones altas de glucosa en la sangre. La insulina es una hormona anabólica sintetizada en las células beta (β) ubicadas en los islotes pancreáticos de Langerhans, esta hormona mantiene la homeostasis de glucosa en la sangre, ya que permite su entrada y almacenamiento en el tejido muscular y adiposo, además, permite el almacenamiento e inhibe la producción de glucosa en el hígado (Fig. 1), la insulina también promueve la división y crecimiento celular mediante sus efectos mitogénicos (Vázquez *et al.*, 2017). El efecto de la DM no controlada es la hiperglucemia (aumento de la glucosa en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (OMS, 2022).

La DM causa la alteración del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, por la falta relativa o completa de la secreción de insulina por las células β o por defecto de los receptores de insulina (Naranjo, 2016). La glucosa al no poder ser utilizada como combustible metabólico, otras biomoléculas como los lípidos y las proteínas son utilizadas, produciendo un incremento en la formación de AcetilCoA (ACoA) los cuales saturan el ciclo de Krebs, forzando al ACoA a entrar a la ruta de biosíntesis de cuerpos cetónicos, incrementándolos y generando complicaciones (cetoacidosis) (Castro, 2015; Díaz y Delgado, 2016). La cetoacidosis es una complicación grave de la DM caracterizada por altas concentraciones de glucosa en sangre y en la orina, que provoca deshidratación, disminución del pH sanguíneo, vómitos, dolor abdominal, aumento de la frecuencia respiratoria (hiperventilación) y si no se corrige produce la muerte (Herrera *et al.*, 2012; Descalzo y Velasco, 2017). Se ha sugerido y casi confirmado en los últimos años que la insulina no solo se transporta de manera efectiva a través de la barrera hematoencefálica (BHE), sino que también se puede producir en el cerebro, donde podría tener múltiples funciones, como ser un regulador de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética y efectos sobre la función cognitiva, incluido el aprendizaje y la memoria. Además, hay muchos receptores de insulina en el cerebro que juegan un papel crucial en el proceso cognitivo (Blázquez *et al.*, 2014; Csajbók y Tamás, 2016; Sánchez *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

La DM tiene múltiples etiologías e incluye un grupo de enfermedades con procesos patogénicos como trastornos genéticos, ambientales y autoinmunes que conducen a alteraciones en la función de las células β , provocando deficiencia en la secreción y distintos grados de resistencia a la insulina, donde los

mecanismos pueden asociarse con un aumento de la producción de glucosa en el hígado y disminución de la captación de glucosa en el tejido muscular y adiposo a un nivel de insulina establecido (Fig. 4). Además, la disfunción de las células β da como resultado una reducción de la liberación de insulina, haciéndola insuficiente para mantener concentraciones normales de glucosa. La resistencia a la insulina y la disfunción de las células β ocurren temprano en la patogénesis de la DM tipo 2 (Zheng *et al.*, 2018). Cuando se habla de resistencia a la insulina, se habla de una condición sistémica en la que las células dejan de responder a esta hormona. Las causas moleculares de la resistencia a la insulina son diversas: involucra defectos en la unión de la insulina a su receptor y alteraciones posteriores a dicha unión tales como la disminución en el número de receptores de insulina y de la actividad de las cinasas (PI3K y Akt), defectos en la expresión y la función de los transportadores de glucosa (GLUT), y aumento de la fosforilación en residuos de serina/treonina de proteínas como el receptor de insulina o IRS, siendo este último mecanismo clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Vázquez *et al.*, 2017).

El funcionamiento normal para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo depende de una respuesta secretora de insulina normal y de la sensibilidad tisular normal a la hiperinsulinemia y la hiperglucemia (es decir, el efecto de acción masiva de la glucosa) para aumentar la captación de glucosa. A su vez, los efectos combinados de la insulina y la hiperglucemia para promover la eliminación de la glucosa dependen de tres mecanismos estrechamente acoplados: 1) supresión de la producción de glucosa endógena (principalmente hepática); 2) estimulación de la captación de glucosa por los tejidos esplácnicos (hepáticos más gastrointestinales); y 3) estimulación de la captación de glucosa por tejidos periféricos, principalmente músculos. La captación de glucosa muscular está regulada por el flujo a través de dos vías metabólicas principales: la glucólisis (de la cual ~90% representa oxidación de glucosa) y la síntesis de glucógeno (Cersosimo *et al.*, 2018).

Los islotes pancreáticos están constituidos por cuatro tipos celulares: células β , α , δ y PP o F, las cuales sintetizan y liberan hormonas como insulina, glucagón, somatostatina y el polipéptido pancreático, respectivamente. Durante la DM, la glucemia se eleva a valores anormales alcanzando concentraciones nocivas para los sistemas fisiológicos, provocando daño en el tejido nervioso (neuropatías), alteraciones en la retina (retinopatía), el riñón (nefropatía) y en todo el organismo, con un pronóstico letal si no se controla (Cervantes y Presno, 2013). La liberación de insulina es un proceso indispensable en la homeostasis del cuerpo como respuesta al aporte energético del consumo de alimentos (Fig. 1). Su liberación es inducida principalmente al incremento de glucemia, pero al mismo tiempo es regulada por

diversas sustancias (nutrimentos, hormonas, neurotransmisores del sistema nervioso autónomo, entre otras) (Santulli *et al.*, 2012).

Para la entrada de glucosa a las células, como se ha mencionado anteriormente se requiere de insulina, esta insulina se une y activa a su receptor de transmembrana con actividad tirosina quinasa, codificado por el gen *INSR* localizado en el cromosoma 19. La unión de la insulina al receptor produce cambios conformacionales dentro del receptor en las subunidades α que activan las subunidades β que se autofosforilan en residuos de tirosina; esto permite que el receptor fosforile residuos de tirosina (actividad tirosina-quinasa) en proteínas diana del citoplasma de las células, transmitiendo la señal a su interior. La fosforilación del receptor de insulina (IR) recluta proteínas adaptadoras como las del sustrato del receptor de insulina (IRS) y la proteína Shc, que organizan complejos moleculares y desencadenan cascadas de señalización intracelular. Entre las vías mediadas por IRS están la activación de las cinasas por la vía de fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K) y la proteína cinasa B (Akt), que desempeña el papel de las funciones metabólicas de la insulina, principalmente la de captación de glucosa por las células, donde Akt permite la translocación de la proteína transportadora de glucosa (GLUT) (en el caso del músculo, tejido adiposo y renal se expresa GLUT 4), de vesículas intracelulares a la superficie celular para incrementar la captura de glucosa, además, esto ayuda a la inhibición de la gluconeogénesis y favorece la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas en tejido hepático, adiposo y muscular, respectivamente, así como la síntesis de energía en forma de ATP, por lo que es común que se encuentren alteraciones en la actividad de AKT en células en un estado de DM. Por su parte, las acciones mitógenicas (división y crecimiento celular) de la insulina se llevan a cabo a través de la proteína adaptadora Shc, que activa la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPKs/Ras) (Reyes y Arellano, 2008; Vázquez *et al.*, 2017; Petersen y Shulman, 2018; Tokarz *et al.*, 2018).

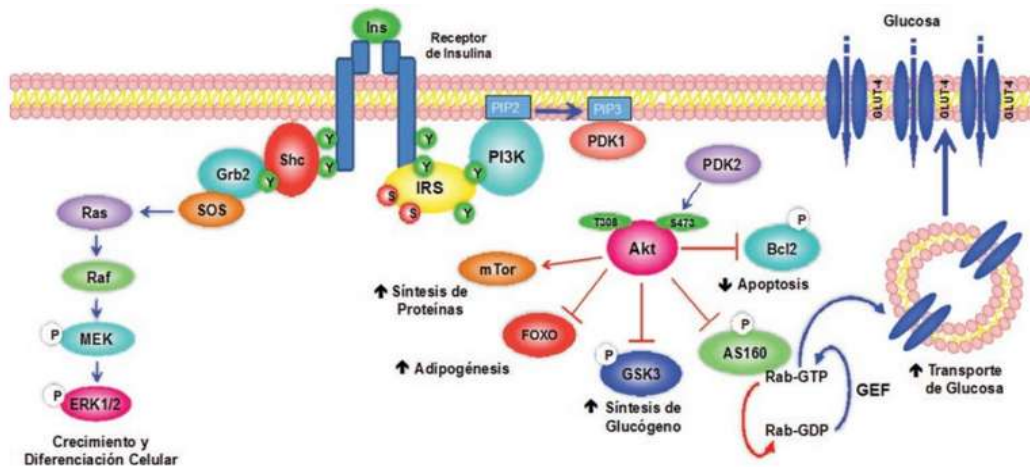


Figura 1. Insulina como regulador de la entrada de glucosa a la célula. La insulina ayuda a la glucosa (o azúcar), proveniente de los alimentos, a entrar a las células y obtener energía para nuestro cuerpo. La unión de insulina a IR, permite la fosforilación de este que a su vez activa a PI3K que al encontrarse fosforilada cataliza la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-1,4,5-bisfosfato (PIP2), que a partir de PIP3 se reclutan y activan las proteínas efectoras quinasa 1 dependiente de fosfoinositido (PDK1) y Akt. Después de unirse PIP3, Akt se activa por fosforilación de PDK1 y PDK2. AS160, (sustrato de Akt de 160 KDa) es una proteína que en su estado no fosforilado es activa y regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas Rab que participan en el tráfico vesicular, de manera que al estar fosforilada regula positivamente a las proteínas G que se encargan de fosforilar vesículas que contienen GLUT, permitiendo la migración de las vesículas a la membrana plasmática y posterior exocitosis para permitir la entrada de glucosa a las células (Vázquez *et al.*, 2017).

La despolarización de la célula β provoca la liberación de insulina; el proceso inicia con el aumento de la concentración plasmática de carbohidratos: la fructosa y la glucosa ingresan en la célula β a través del transporte facilitado mediado por el transportador de glucosa 2 (GLUT2) (Santulli *et al.*, 2012). La célula β dentro del páncreas, productoras de insulina es donde se dan las interacciones de proteínas en la cascada de síntesis/secreción de insulina. En el estado de reposo, la síntesis de insulina y la secreción basal se rigen por la concentración de glucosa basal. La transcripción del gen de la insulina (*INS*) está regulada por una serie de factores reguladores que se unen a los componentes aguas arriba del *INS* en el cromosoma 11. El canal de potasio regulado por ATP (K_{ATP}) se rige por la relación ATP:ADP, este permanece abierto en el estado basal, lo que permite la salida de potasio del interior al exterior de la célula β y deja la membrana plasmática en un estado hiperpolarizado. Cada canal de K_{ATP} consta de; cuatro subunidades del canal de potasio de rectificación (Kir6.2) en el interior, y cuatro unidades de regulación alrededor, además del receptor de sulfonilurea (SUR1). Los canales de calcio dependientes de voltaje, designados como Cav1.2/1.3 y Cav2.3. Los gránulos de insulina almacenados alineados en la membrana celular constituyen un grupo de insulina de liberación rápida responsable de la respuesta de insulina de primera fase después de que la glucosa se eleva de forma aguda. Un grupo de gránulos de insulina de liberación más lenta es más interno, pero puede movilizarse para constituir la respuesta de

insulina de segunda fase cuando se mantiene una glucosa más alta. En el estado estimulado, cuando la glucosa en sangre aumenta después de una comida, ingresa a la célula β a través del transportador de glucosa GLUT2, un proceso no regulado por insulina. La glucocinasa (GK) que actúa como un sensor de la concentración de glucosa dentro de la célula β , fosforila la glucosa a glucosa-6-fosfato (G6P), lo que permite que su metabolismo produzca ATP. El incremento de ATP:ADP da como resultado el cierre del canal de K_{ATP} , retención de K^+ intracelular, que conduce a la despolarización de la membrana, y a la apertura del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje que permite la entrada de calcio y la secreción de insulina como respuesta de primera y luego de segunda fase. De esta manera, la energía química de la glucosa se convierte en la actividad eléctrica de la célula β , creando un efecto reóstato, con alta secreción de insulina cuando la glucosa es alta y una caída en la secreción de insulina a medida que la glucosa cae en respuesta a las acciones de insulina (Fig. 2) (Sperlin y Garg, 2018; Campbell y Newgard, 2021).

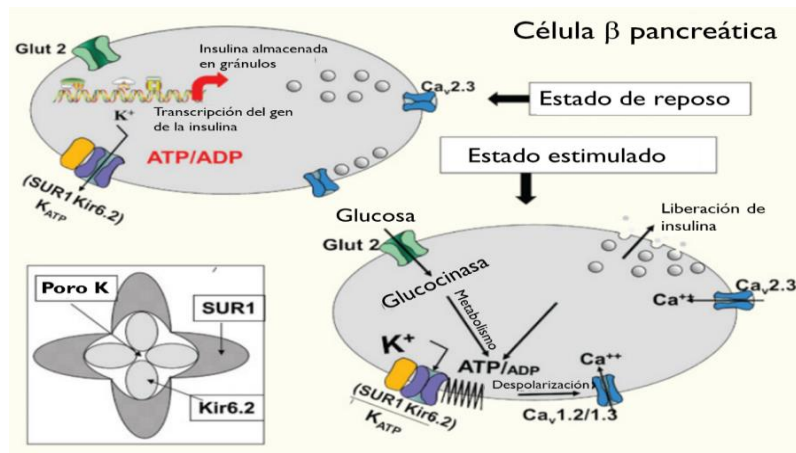


Figura 2. Representación esquemática de una célula beta (β). Se muestra la representación de una célula beta en condiciones de estado de reposo y estimulado (Sperlin y Garg, 2018).

II.1.1.1 Diagnóstico y fármacos para el tratamiento de diabetes mellitus

Se utilizan tres parámetros para el diagnóstico de la DM: la glucemia plasmática (concentración de glucosa en sangre), la sobrecarga oral de glucosa (SOG) y el valor de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Estos criterios se han aceptado en base a estudios, que han demostrado que las concentraciones de glucemia medidos por estos parámetros y que están por encima de las concentraciones normales presentan mayor número de retinopatía. Los puntos de corte han variado a lo largo de los años, aceptándose para el diagnóstico de DM una glucemia plasmática basal \geq a 100 mg/dL (7.0 mmol/L) realizada en cualquier momento, que se acompañe de síntomas clásicos de hiperglucemia, una cifra de glucemia plasmática a las 2 horas de una SOG \geq a 200 mg/dL (1.1 mmol/L), o una cifra de HbA1c \geq

6.5% (Naya y Álvarez 2016). La elevación crónica del azúcar en sangre, denominada "hiperglucemia", es el principal parámetro bioquímico de diagnóstico para cualquier tipo de DM (Chaudhury *et al.*, 2017).

El tratamiento de la DM está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y prevención de complicaciones agudas y crónicas. Las principales clases convencionales de medicamentos para el tratamiento de hiperglicemia incluye: sulfonilureas que mejoran la liberación de insulina de los islotes pancreáticos, biguanidas que reducen la producción de glucosa hepática, agonistas del receptor y activador a través del proliferador de peroxisoma (PPAR γ) que aumenta la acción de la insulina, inhibidores de α -glucosidasa (α -glu) que interfieren con la absorción de glucosa en el intestino. Estos fármacos se administran en monoterapia o en combinación con otros hipoglucémicos (Tanayen *et al.*, 2014; Chaudhury *et al.*, 2017). Algunos inconvenientes asociados al uso de fármacos convencionales son: hipoglucemia grave, insuficiencia hepática, aumento de peso, taquicardia e hipotiroidismo (demostrado por sulfonilureas), menor eficacia terapéutica debido a un régimen posológico (control y duración del tratamiento) inadecuado o ineficaz, baja potencia, efectos secundarios adversos debido al metabolismo del fármaco y falta de problemas de especificidad del objetivo, solubilidad y permeabilidad. Estos fármacos también presentan algunos beneficios y ventajas, como una dosis reducida, un inicio rápido de acción, un perfil de liberación controlado, una administración optimizada del fármaco, una vida media amplia, una variabilidad mínima del paciente y una disponibilidad optimizada (Tabla 1). A pesar de estos fármacos antihyperglucémicos prometedores, los principales retos para un tratamiento eficaz de la enfermedad incluyen la optimización de las terapias, así como la reducción de complicaciones a largo plazo relacionadas con la DM (Padhi *et al.*, 2020; Alam *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2023 a).

Algunos de los medicamentos asociados con pérdida de peso son las biguanidas, donde se encuentran la metformina (MF) (Mellado *et al.*, 2019). La MF a menudo se considera el tratamiento de primera línea en la DM2, sus acciones principales son brindar una mayor absorción de glucosa por los músculos, el hígado y los tejidos adiposos a través de la activación de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMP), un efector de la MF, también causa una reducción de la producción de glucosa hepática con una mejor resistencia a la insulina y la inhibición de la rapamicina en los mamíferos en la vía mTOR. La MF también podría actuar sobre el intestino para liberar incretinas mejorando la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa (Xie *et al.*, 2018). La MF puede tener efectos secundarios adversos como los mencionados anteriormente, pero el efecto secundario más frecuente es la diarrea que se produce en torno al 30% de los pacientes. Otros efectos gastrointestinales son: sabor metálico, acidosis

láctica, epigastralgia, náuseas, vómitos y flatulencia. Además, interfiere en la absorción de la vitamina B12 que se ha asociado con un empeoramiento de la neuropatía diabética (ND) (Reyes *et al.*, 2016; Alam *et al.*, 2022). Los agentes antidiabéticos como la MF y la glibenclamida que solo afectan el nivel de glucosa en sangre, no tienen un efecto considerable sobre las complicaciones presentadas en la DM, tales como la neuropatía, retinopatía, infartos, entre otros (Bahramsoltani *et al.*, 2021) (Tabla 1). En última instancia, la forma más eficaz de reducir el riesgo de complicaciones vasculares para cualquier tipo de DM es lograr un control glucémico óptimo con el objetivo de alcanzar la normogluemia lo antes posible en el curso de la enfermedad (Forbes y Cooper, 2013).

Medicamento	Actividad	Ventajas	Desventajas
Biguanidas (Metformina)	Reducen la producción de glucosa hepática, además ayudan a una mayor absorción de glucosa por los músculos, el hígado y los tejidos adiposos, y una mejor resistencia a la insulina. Liberación de incretinas, mejorando la secreción de insulina y mejorar la homeostasis de la glucosa.	Se pueden administrar en monoterapia o en combinación con otros hipoglucémicos, también presentan una dosis reducida, un inicio rápido de acción, un perfil de liberación controlado, una administración optimizada del fármaco, una vida media amplia, una variabilidad mínima del paciente y una disponibilidad optimizada.	Pueden presentar hipoglucemia grave, aumento o pérdida de peso, menor eficacia terapéutica, baja potencia y efectos secundarios alterados debido al metabolismo del fármaco, falta de especificidad del objetivo, solubilidad y permeabilidad, taquicardia, hipotiroidismo, insuficiencia hepática, diarrea, efectos gastrointestinales (sabor metálico, epigastralgia, náuseas, vómitos y flatulencia), interfiere en la absorción de la vitamina B12 y no tienen un efecto considerable sobre el riesgo de enfermedades cardiovasculares relacionadas con la diabetes.
Sulfonilureas	Mejoran la liberación de insulina de los islotes pancreáticos.		
Agonistas de PPARγ	Aumenta la acción de la insulina		
Inhibidores de α-glu	Interfieren con la absorción de glucosa en el intestino.		

Tabla 1. Actividades, ventajas y desventajas de las principales clases convencionales de medicamentos farmacológicos para la DM.

II.1.2 Tipos de diabetes mellitus

La clasificación de la DM actual más ampliamente utilizada es de la American Diabetes Association (ADA), que se basa fundamentalmente en su etiología y características fisiopatológicas. La cual las clasifica principalmente en Diabetes mellitus tipo 1, Diabetes mellitus tipo 2 y Diabetes mellitus gestacional. A partir de éstas se pueden encontrar y clasificar otros tipos de enfermedad de la DM (Sanzana y Durruty, 2016).

La diabetes tipo 1 se asocia con una dependencia absoluta de la insulina, y en la diabetes tipo 2, hasta el 50% de las personas finalmente requieren insulina para controlar la hipergluemia (Forbes y Cooper,

2013). Debido a que las células β , son afectadas, la producción endógena de insulina desaparece casi por completo siendo necesaria la administración de insulina exógena para controlar la glucemia y evitar las complicaciones de la DM, sosteniendo un funcionamiento normal (BNMEUA., 2013).

II.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo I (DM1) también llamada insulino dependiente, presenta un déficit absoluto en la secreción de insulina. Esta DM1 puede ocurrir a cualquier edad, pero es diagnosticada principalmente durante la infancia o la adolescencia (Castro, 2015). Este proceso ocurre en sujetos predispuestos genéticamente, probablemente desencadenado por uno o más factores ambientales, y generalmente se desarrolla durante meses o años, en los cuales el sujeto está asintomático y euglicémico. La DM1 se produce cuando ocurre una destrucción autoinmune de aproximadamente el 90% de las células β , desarrollando en el paciente una deficiencia de insulina (Díaz y Delgado, 2016; Campbell y Newgard, 2021). Un locus identificado que contribuye a un 40-50% de la susceptibilidad genética de esta enfermedad, está localizado en la región del antígeno leucocitario humano (HLA) del cromosoma 6p, que contiene genes que codifican para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II (Pociot *et al.*, 2010). Estas moléculas pueden ligarse a los antígenos que intervienen en la patogénesis de la DM1. Esto permite que dichos antígenos sean presentados a los receptores de las células T, que son las mayores efectoras del proceso destructivo autoinmune (Díaz y Delgado, 2016). Debido a la afectación de las células β , la producción endógena de insulina desaparece casi por completo siendo necesaria la administración de insulina exógena para controlar la glucemia, y sostener un funcionamiento normal. Debido a la baja o nula cantidad de insulina, ocurre un aumento de glucosa en la sangre, donde esta glucosa puede unirse a lipopolisacáridos y a la hemoglobina favoreciendo la formación de ateromas (abultamiento de una arteria). Además, al no poder usarse la glucosa como combustible metabólico, se favorece la digestión de lípidos y proteínas que aportan menor cantidad de energía apareciendo síntomas de polifagia (sensación de hambre) y de adelgazamiento (Castro, 2015; Díaz y Delgado, 2016).

II.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

La obesidad mórbida se asocia con el desarrollo de diferentes enfermedades, entre la que destaca la DM. Durante la obesidad, el páncreas tiene una hiperactividad por la concentración alta y constante de glucosa en sangre, con una secreción de insulina elevada para conservar la glucemia en concentraciones normales (Ley *et al.*, 2018). Las causas desencadenantes de la DM tipo 2 (DM2) no se conocen en el 70-85% de los pacientes. Pueden existir diferentes factores que influyen en el padecimiento de la enfermedad como

la herencia poligénica, factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de DM, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria (Cervantes y Presno, 2013). El tejido adiposo, el hígado, los músculos y el páncreas son en sí mismos sitios de inflamación en presencia de obesidad. La infiltración de células inmunitarias, así como la presencia de citocinas proinflamatorias en estos tejidos, se ha asociado con resistencia a la insulina y deterioro de las células β . También se ha planteado la posibilidad de que la disfunción endotelial y los cambios en la permeabilidad capilar vascular afecten la acción de la insulina periférica. Estos mecanismos patogénicos deben tenerse en cuenta a la hora de decidir el tratamiento de la hiperglucemia en pacientes con DM2 (Cersosimo *et al.*, 2018).

La DM2 o “diabetes mellitus No Insulino dependiente”, es una combinación de una resistencia a la acción de la insulina y una respuesta compensatoria de insulina inadecuada, por lo que se presentan concentraciones elevadas de glucosa al igual que en la DM1 (Castro, 2015). La DM2 es el tipo más común de esta enfermedad, ya que representa hasta un 91% de los casos. La DM2 es muy infrecuente por debajo de los 45 años, con un aumento claro de su incidencia a partir de los 60 años (Díaz y Delgado, 2016). La DM2 es una enfermedad heterogénea que involucra múltiples factores conductuales, metabólicos y genéticos. La aparición de diabetes se caracteriza por un deterioro progresivo de la tolerancia a la glucosa (Ley *et al.*, 2018; Campbell y Newgard, 2021).

Existen ocho causas principales conocidas que conducen a la hiperglucemia en la patogénesis de la DM2, conocida como el “octeto ominoso” (Fig. 3). Ya que la disminución de la captación periférica de glucosa combinada con el aumento de la producción de glucosa endógena (hepática) son características de la resistencia a la insulina. El aumento de la lipólisis con la acumulación de metabolitos lipídicos intermedios aumenta la producción de glucosa al tiempo que reduce la utilización periférica. Las secreciones compensatorias de insulina por las células β pancreáticas finalmente alcanzan un máximo y luego se deteriora progresivamente. Al mismo tiempo, hay una liberación inapropiada de glucagón de las células alfa pancreáticas, particularmente en el período posprandial (valor plasmático de glucosa obtenido a las dos horas posteriores a la ingestión de comida), que provoca el aumento de glucosa. Se ha postulado que tanto la alteración de la insulina como la secreción excesiva de glucagón en la DM2 se ven facilitadas por el “defecto de las incretinas”, principalmente como respuesta inadecuada de las hormonas incretinas gastrointestinales a la ingestión de comida, además de la resistencia de las células de los islotes a la acción potenciadora de la secreción de insulina por estos péptidos

gastrointestinales. Asimismo, teniendo en cuenta que la resistencia a la insulina hipotalámica (sistema nervioso central) con un impulso simpático elevado, que se observa típicamente en pacientes con DM2, también afecta la capacidad de la insulina circulante para suprimir la producción de glucosa. El hecho de que la capacidad de reabsorción de glucosa en los túbulos renales se incremente en los pacientes diabéticos también contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hiperglucemia crónica (Cersosimo *et al.*, 2018).

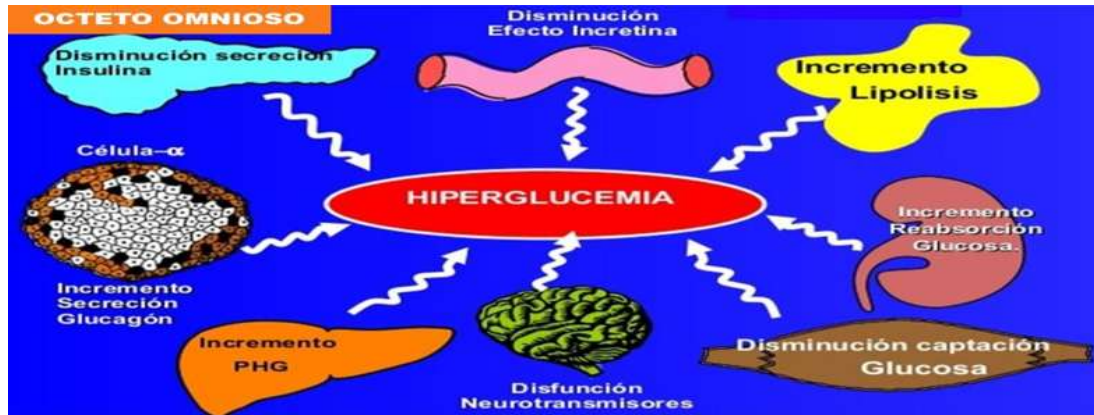


Figura 3. Los ocho mecanismos principales que contribuyen a hiperglucemia en pacientes con DM2. Causas principales conocidas que conducen a la hiperglucemia a través de la patogénesis de la DM2. PHG: producción hepática de glucosa (Modificado de Cersosimo *et al.*, 2018).

Cuando los circuitos de retroalimentación entre la acción de la insulina en sus tejidos sensibles como el hígado, los músculos y el tejido adiposo (resistencia a la insulina en la DM2) y la secreción de insulina por las células β de los islotes pancreáticos (disfunción celular β) no funcionan, da como resultado niveles anormales de glucosa en sangre (Fig. 4) (Zheng *et al.*, 2018).

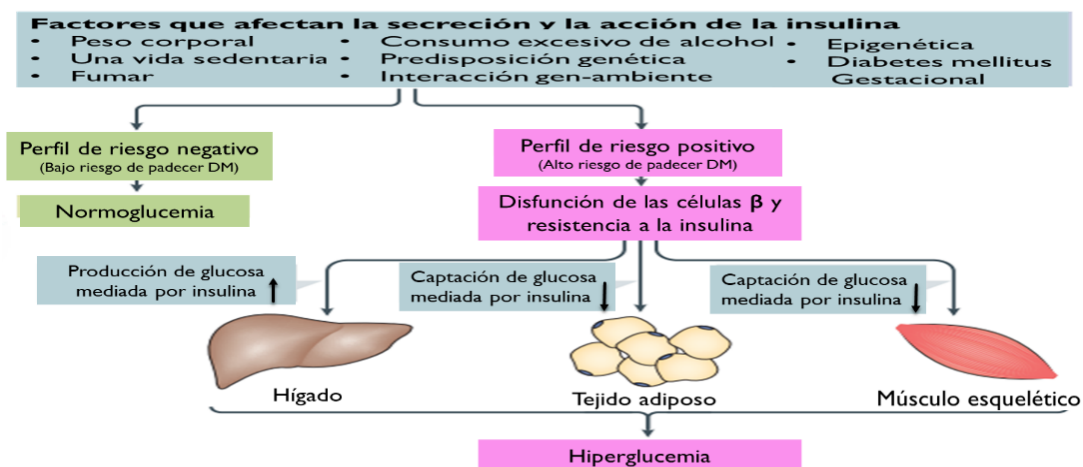


Figura 4. Fisiopatología de la hiperglucemia en DM2. La secreción de insulina de las células β reduce la producción de glucosa en el hígado y aumenta la captación de glucosa por el músculo esquelético y el tejido adiposo. La disfunción de las células β y/o resistencia a la insulina en los tejidos sensibles provoca hiperglucemia, que conduce a una cantidad excesiva de glucosa circulando en la sangre. Los diversos factores enumerados en la parte superior afectan la secreción y la acción de la insulina (Modificado de: Zheng *et al.*, 2018).

II.1.2.3 Diabetes mellitus gestacional

En las mujeres, el aumento de obesidad ha aumentado la incidencia de la diabetes mellitus gestacional (DMG). Los factores de riesgo conocidos de predisposición a la DMG incluyen la edad materna avanzada, el origen étnico, antecedentes familiares de DM2 o hiperglucemia, sobrepeso u obesidad antes del embarazo, síndromes metabólicos, dieta nutricional mala, síndrome de ovario poliquístico (SOP), preeclampsia, genética, entre otros (Lende y Rijhsinghani, 2020). La DMG se define como cualquier intolerancia a los carbohidratos diagnosticada por primera vez durante el embarazo (Medina *et al.*, 2017), debido a la alteración de la tolerancia a la glucosa como resultado de la disfunción de las células β de la madre, provocando insuficiencia o resistencia de insulina para regular la homeostasis de la glucosa durante el embarazo (Plows *et al.*, 2018; Alejandro *et al.*, 2020). Los resultados adversos de la DMG en el embarazo están relacionados principalmente con el riesgo de malformación fetal debido al efecto teratogénico de la glucosa y/o sus anomalías metabólicas (obesidad, hipertensión, dislipidemia, etc.) causando un círculo vicioso intergeneracional de obesidad y DM, otra consecuencia de la DMG es que puede producir macrosomía (recién nacido mucho más grande que el promedio) causada por el hiperinsulinismo fetal en respuesta a las concentraciones altas de glucosa derivados de la hiperglucemia materna, de manera que las hormonas del embarazo pueden bloquear el trabajo que hace la insulina. Como resultado, si las concentraciones de glucosa materna son altas y descontrolados, existe un exceso de glucosa transportada a través de la placenta que induce un aumento de la producción de insulina fetal (Baz *et al.*, 2016; Plows *et al.*, 2018; Alejandro *et al.*, 2020; Illsley y Baumann, 2020).

II.1.3 Complicaciones de la diabetes mellitus

Las complicaciones crónicas de la DM comprenden trastornos microcirculatorios (microvasculares), es decir daño en vasos sanguíneos pequeños y macrocirculatorios (macrovasculares) debido al daño en arterias. Las complicaciones microcirculatorias se producen en tejidos corporales independientes de la insulina, tejidos que no requieren la presencia de insulina para que la glucosa ingrese en las células tisulares en estado post-absortivo. Esta independencia de insulina probablemente implica que la concentración de glucosa en muchos de estos tejidos es similar a la concentración sanguínea (Carrasco, 2017). Por el contrario, la captación de glucosa mediada por insulina tiene lugar sólo en tejidos sensibles, la insulina estimula la captación de glucosa en el músculo esquelético, que es el sitio más grande para la eliminación de la glucosa de la dieta, y en el tejido adiposo, mientras que en el hígado disminuye la tasa de producción de glucosa hepática al aumentar el almacenamiento de glucosa como glucógeno (Hanhineva *et al.*, 2010). Las complicaciones macrovasculares afectan a las arterias que irrigan el corazón, cerebro y las extremidades inferiores, las cuales incluyen enfermedad cardiovascular acelerada (ECV) que resulta en infarto de miocardio, apoplejía, enfermedad cerebrovascular y amputación de extremidades inferiores, siendo aproximadamente tres veces mayor el riesgo de padecer estas complicaciones en un paciente diabético en comparación con la población general (Cole y Florez, 2020). Las complicaciones microvasculares son muy frecuentes, y la mitad de los pacientes con DM2 las presentan, estas incluyen retinopatía, nefropatía y neuropatía que están estrechamente asociadas con las disminuciones cognitivas (Zheng *et al.*, 2017). Otras complicaciones crónicas de la DM incluyen depresión, ansiedad, demencia y disfunción sexual. La DM también se asocia con una enfermedad macrovascular aterosclerótica acelerada que afecta a las arterias que irrigan el corazón, el cerebro y las extremidades inferiores. Además, las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH) y el superóxido (O_2) son indicadores primarios de estrés oxidativo que proliferan en presencia de DM. El estrés oxidativo puede ser causado por la sobreproducción de ROS por reacciones metabólicas que utilizan oxígeno y cambian el equilibrio entre los estados oxidante/antioxidante a favor de los oxidantes. Una vez producido, el estrés oxidativo puede dañar los lípidos, las membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Demir *et al.*, 2021).

II.1.3.1 Complicaciones macrovasculares

Los trastornos cardiovasculares en la diabetes incluyen aterosclerosis prematura, que se manifiesta como infarto de miocardio y apoplejía, deterioro de la función cardíaca, predominantemente disfunción

diastólica. La aterosclerosis es un proceso complejo que involucra numerosos tipos de células e importantes interacciones de célula a célula que, en última instancia, conducen a la progresión de la "grasa" hasta la formación de placas ateroscleróticas complejas. Estas placas ateroscleróticas complejas pueden desestabilizarse y romperse, dando lugar a infarto de miocardio, angina inestable o accidentes cerebrovasculares (Zheng *et al.*, 2017). La miocardiopatía se caracteriza por disfunción diastólica (DD), que es una incapacidad del corazón para relajarse y llenarse de sangre durante la parte diastólica del ciclo cardíaco. La principal consecuencia clínica de la DD es la disnea de esfuerzo, que impide la capacidad de los diabéticos para realizar ejercicio, un aspecto importante del manejo de la DM, particularmente en el contexto de la obesidad (Forbes y Cooper, 2013).

II.1.3.2 Complicaciones microvasculares

El daño inducido por hiperglucemia en la red microvascular en el riñón, los ojos y los nervios es mucho más común y tiene un efecto sustancial sobre la mortalidad. La enfermedad renal diabética (DKD, de sus siglas en inglés Diabetic kidney disease) a menudo denominada nefropatía diabética, es un trastorno progresivo definido por una función renal reducida debido a la hiperglucemia, que a menudo coexiste con albuminuria (Martínez *et al.*, 2015). La DKD no tiene cura, el tratamiento implica el control de las concentraciones de glucosa en sangre, proteinuria, daño renal hasta las últimas etapas de la DKD, en las que la diálisis o el trasplante de riñón suelen ser necesarios para la supervivencia. La DKD sigue siendo la causa más común de enfermedad renal en etapa terminal, que a su vez se asocia con un aumento de la mortalidad (Cole y Florez, 2020).

La retinopatía diabética (RD) debido a la hiperglucemia provoca daños progresivos en los vasos sanguíneos de la retina, lo que provoca hemorragia, desprendimiento de retina y ceguera. La gravedad de la RD se asocia con la duración de la DM, la edad en el momento del diagnóstico, las concentraciones de HbA1c, la presión arterial, la insulina, uso y presencia de proteinuria (Cole y Florez, 2020).

La neuropatía diabética (ND) por causa de la DM es una de las principales causas de daño a los nervios, en particular a los nervios periféricos más largos que inervan las extremidades inferiores. Además del dolor excesivo y la disminución de la calidad de vida asociados con la ND, las personas con DM tienen un riesgo de por vida de 15 a 25% de ulceraciones del pie y un riesgo 15 veces mayor de amputación de una extremidad en comparación con las personas sin DM (Pop-Busui *et al.*, 2017). La ND es la complicación que tiene el mayor riesgo de presentarse en la DM, ya que afecta aproximadamente al 30% de las personas con DMI y a >50% de las personas con DM mayores de 50 años, es una de las

complicaciones menos estudiadas, ya que es difícil de medir de manera directa y precisa, y el tratamiento se basa en la prevención con control de glucosa, manejo de dolor y síntomas (Cole y Florez, 2020).

II.1.4 Mecanismos de daño tisular presentes en la diabetes mellitus

La DM altera la función biológica de muchos órganos del cuerpo debido a la glucotoxicidad crónica, modificando numerosas vías en el metaboloma biológico. Durante el desarrollo y la progresión de la DM, muchas vías se regulan positivamente en un intento de manejar el aumento de glucosa en el cuerpo (Yan, 2018). La DM conduce a muchas enfermedades como ya se ha mencionado, las complicaciones microvasculares específicas de la DM son la causa de muchas de estas enfermedades. Las cinco vías principales que se cree desarrollan patologías microvasculares y macrovasculares en la DM son: 1) aumento del flujo de la vía de los polioles (vía del sorbitol); 2) aumento de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE); 3) activación de isoformas de proteína quinasa C (PKC); 4) aumento del flujo de la vía de la hexosamina y 5) la vía del enodiol/alfa-cetoaldehído (Yan, 2018). Todas estas vías convergen en la elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por una variedad de sistemas de generación de ROS (Luo *et al.*, 2016). Todos estos factores reflejan una excreción excesiva de moléculas tóxicas, debido al aumento de síntesis de superóxido a través de la cadena de transporte de electrones. Los mecanismos de daño por hiperglucemia incluyen y dan como resultado las enfermedades microvasculares y macrovasculares (Ahmed *et al.*, 2020).

II.1.4.1 Vía del sorbitol

En condiciones normoglucémicas, el propósito principal de la combustión de glucosa es producir energía en forma de ATP, producir NADPH y ribosa a través de la vía de las pentosas fosfato. El exceso de glucosa se almacena en el cuerpo como glucógeno o ácidos grasos (Fig. 5 (A)). Casi todas las reacciones bioquímicas en el metabolismo de la glucosa son en realidad reacciones redox, ya que la glucosa proporciona electrones que se almacenan principalmente en NADH, cuanto más alta es la concentración de glucosa en sangre, mayor es el contenido de NADH. Esto puede inclinar el equilibrio redox entre NADH y NAD⁺ hacia el lado de NADH, dando como resultado un desequilibrio redox. Esto es lo que ocurre en la DM y se sabe que la vía de los poliol juega un papel importante en la ruptura del equilibrio redox entre NADH y NAD⁺ (Wu *et al.*, 2017). Los polioles o polialcoholes son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo. Dentro de esta familia de compuestos destacan los glucitoles (conocido como sorbitol), glúcidos a los que se les ha reducido el grupo carbonilo a alcohol (Escobar, 1995; Yan., 2018).

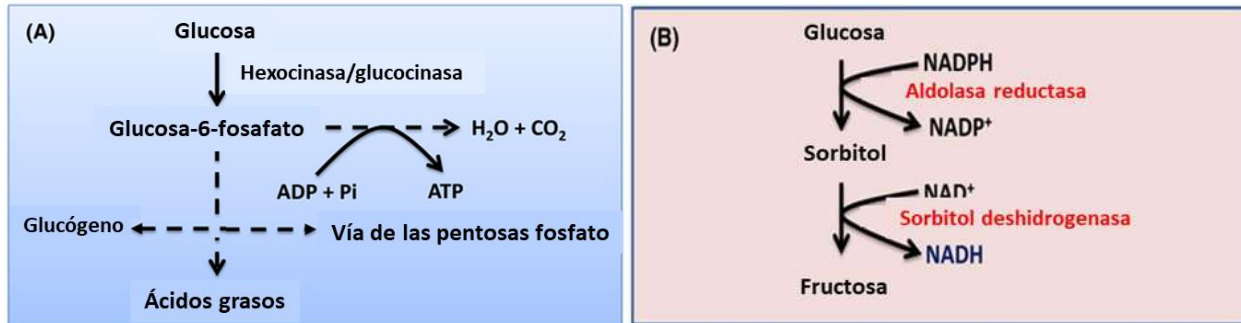


Figura 5. Vías metabólicas de la glucosa en condiciones euglucémicas e hiperglucémicas. (A) En condiciones fisiológicas normales, la glucosa produce energía (ATP) a través de la glucólisis y las vías del ciclo de Krebs. La glucosa también puede fluir a la vía de las pentosas fosfato que produce NADPH y ribosa. El exceso de glucosa se puede almacenar como glucógeno o ácidos grasos. (B) En condiciones de DM, el 30% de la glucosa fluye a la vía de los poliol, mediante la cual la glucosa se convierte en fructosa a través de 2 reacciones consecutivas que también transforman NADPH en NADH (Modificado de: Yan, 2018).

La vía del sorbitol también conocida como vía del poliol consta de dos reacciones catalizadas por dos enzimas. La primera reacción es la reducción de glucosa a sorbitol, que es catalizada por la aldosa reductasa (AR). Esta reacción, es la reacción limitante en esta vía y también convierte NADPH en NADP⁺, su capacidad para catalizar la reducción de la glucosa es casi insignificante en condiciones normogluceicas. Por el contrario, cuando el nivel de glucosa es alto, esta enzima y la vía de los poliol se convierten en una vía importante para eliminar la glucosa. La segunda reacción convierte el sorbitol en fructosa y es catalizada por la sorbitol deshidrogenasa, que produce NADH a partir de NAD⁺ (Fig. 5 (B)) (Yan, 2018), lo que provoca la activación de la PKC por el aumento de la relación NADH/NAD⁺ (Unuofin y Lebelo, 2020). Debido a que casi el 30% de la glucosa en sangre puede fluir a través de la vía de los poliol en la DM, se ha pensado que esta vía es la principal contribuyente al desequilibrio redox NADH/NAD⁺ que conduce a la producción de ROS y estrés oxidativo (Wu *et al.*, 2017), así como, disminuir la relación NADPH/NADP⁺ y la producción de óxido nítrico trayendo como consecuencia complicaciones o discapacidad vascular, también puede inducir la acumulación de sorbitol y el estrés osmótico, aumentar el contenido de fructosa lo que conduce a un aumento de la glicación de proteínas y al desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). En general las consecuencias de estos eventos son complicaciones diabéticas que incluyen retinopatía (por el estrés osmótico), nefropatía y neuropatía (Aldebasi *et al.*, 2013; Yan, 2018). El exceso de glucosa produce sorbitol que lucha por filtrarse en las membranas celulares, provocando así hinchazón de las células osmóticas, deterioro de la estructura y función celular, disminución de la actividad de la ATPasa y, en última instancia, poniendo en movimiento el metabolismo celular y daño funcional (Unuofin y Lebelo, 2020).

II.1.4.2 Acción de productos de glicación avanzada

Los productos finales de glicación avanzada (AGE) desempeñan un papel central en la génesis y progresión de las complicaciones de la DM. La resistencia a la insulina también parece acelerar el envejecimiento biológico al fomentar la formación de AGE y, en consecuencia, de ROS (Marengo y Lengua, 2016). También la producción excesiva de AGE causa mayor daño a las células β a través de la hiperglucemia (Unuofin y Lebelo, 2020). Los AGE son un grupo complejo y heterogéneo de compuestos formados por la reacción no enzimática de los azúcares reductores como la glucosa con aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando una alteración de su función. Estas reacciones generan diferentes tipos de ROS durante la formación de productos de Amadori y las reacciones que desembocan en AGEs (Calderón *et al.*, 2013).

En la glicación, los azúcares reductores reaccionan con los sitios activos de las macromoléculas para formar bases de Schiff inestables, que luego se reorganizan para formar productos de Amadori (productos de glicosilación temprana), principalmente compuestos de carbonilo (Kang y Yang, 2020), que después se someten a complicados reordenamientos químicos (oxidaciones y deshidrataciones) y se reticulan a macromoléculas para finalmente formar AGE irreversibles y estables (Ott *et al.*, 2014). La reacción entre D-glucosa o D-fructosa y el aminoácido *N*-terminal y/o grupos ϵ -amino de una proteína forma productos de base de Schiff. En el caso de la glucosa, la base de Schiff se somete a un reordenamiento de Amadori para producir un aducto más estable. Con fructosa, la reacción es similar, pero la reacción se denomina producto de transposición de Heyns (con carbono 2 en lugar del carbono 1 de la hexosa) y da como resultado la formación de 2 productos. Estos primeros productos de glicación se someten a reacciones de transposición, deshidratación y condensación adicionales para producir derivados fluorescentes reticulados irreversiblemente, o AGE. La CML proviene de la degradación de los productos de Amadori (Fig. 6). Sin embargo, los AGE específicos de fructosa no se han caracterizado bien (Gugliucci, 2017).

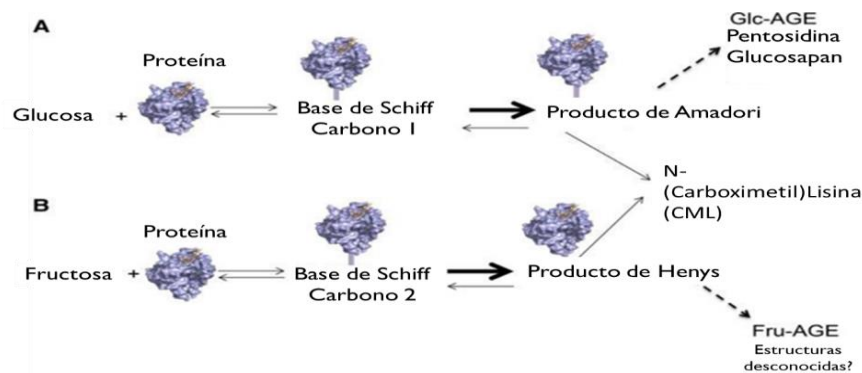


Figura 6. Secuencia simplificada de la glicación de proteínas mediada por glucosa y fructosa. La reacción de Maillard por la glucosa (A) y la fructosa (B) produce diferentes productos de glicación temprana y tardía. Fru-AGE, producto final de glicación avanzada con fructosa; Glc-AGE, producto final de glicación avanzada derivado de glucosa (Modificado de: Gugliucci, 2017).

Durante el proceso, se generan grandes cantidades de radicales libres, lo que a su vez promueve la formación de AGE, que a su vez estimulan la generación de ROS a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los enlaces cruzados no enzimáticos entre la glucosa (u otros azúcares reductores) y los grupos amino provocan daños en las estructuras y funciones de las proteínas, por ejemplo, el endurecimiento de los vasos sanguíneos resultante de la glicación no enzimática del colágeno y la elastina (Kang y Yang, 2020). Esta vía puede promover la activación de NF- κ B que conduce a la apoptosis y la regulación positiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para aumentar la permeabilidad endotelial vascular, así como provocar la pérdida de función de las células, migración y disfunción celular y modificación de proteínas plasmáticas (Gugliucci, 2017; Wu *et al.*, 2018; Unuofin y Lebelo, 2020).

II.1.4.3 Vía de la proteína- cinasa C

La familia de las proteínas quinasas C (PKCs) son serina/treonina quinasas, que contribuyen a la regulación de la permeabilidad de las células endoteliales, estimulando la proliferación celular, el crecimiento vascular, la regulación de la permeabilidad endotelial, la vasoconstricción, la síntesis/renovación de la matriz extracelular (MEC), el crecimiento celular, la angiogénesis, la activación de citocinas y la adhesión de leucocitos. Su activación se ve reforzada por el aumento de los niveles de glucosa en los animales diabéticos y las células vasculares en varios tejidos (retina, aorta, corazón y glomérulos renales) (Cosentino *et al.*, 2012; Unuofin y Lebelo, 2020; Lien *et al.*, 2021). La activación de la PKC regula diversas funciones vasculares mediante la modulación de actividades enzimáticas como la fosfolipasa citosólica A2 y Na⁺, K⁺-ATPasa, y expresiones génicas que incluyen componentes de la matriz extracelular y proteínas contráctiles. La PKC está involucrada en la transducción de señales, puede

responder a los estímulos de hormonas, neuronas y factores de crecimiento específicos. Además, la PKC puede aumentar la actividad de la NADPH oxidasa, que promueve la producción de ROS en muchas células vasculares, incluidas las células endoteliales, las células del músculo liso, los pericitos, las células mesangiales, entre otras. Por tanto, la vía de la PKC inducida por la hiperglucemia puede agravar el estrés oxidativo en las células (Kang y Yang, 2020), además de alterar las acciones de la insulina en los vasos sanguíneos para inducir patologías (Lien *et al.*, 2021). Se han asociado múltiples complicaciones diabéticas con una mayor activación de PKC, estas anomalías incluyen cambios en el flujo sanguíneo, engrosamiento de la membrana basal, expansión de la matriz extracelular, permeabilidad vascular, angiogénesis, crecimiento celular y alteraciones de la actividad enzimática como $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, cPLA2 y MAP quinasa (Fig. 7) (Evcimen y King, 2007).

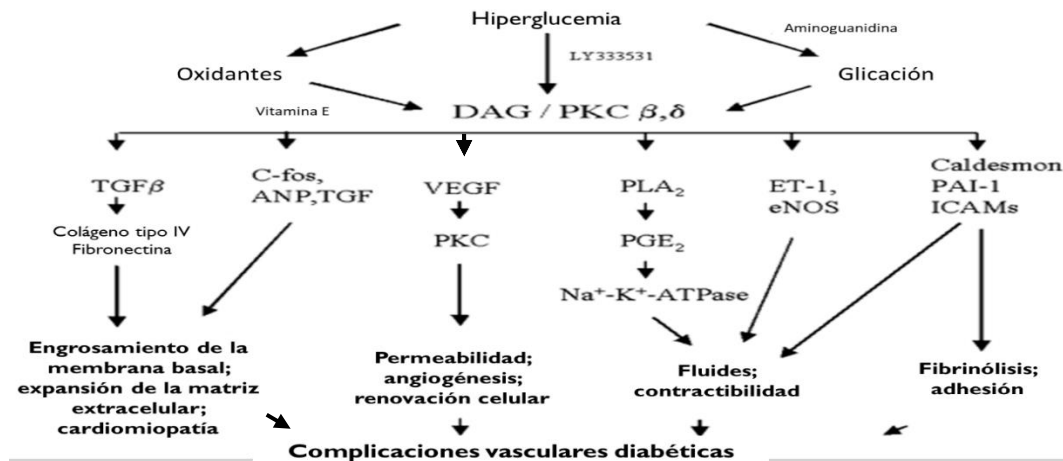


Figura 7. Efectos fisiológicos y mecanismos celulares de la hiperglucemia inducida por la activación de DAG-PKC. (Modificado de: Evcimen y King, 2007).

II.1.5 Complicaciones de la diabetes en el sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que controlan y regulan el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, coordinando su interrelación y cambios en la relación del organismo con el medio externo e interno, evaluando esta información y respondiendo a través de cambios en músculos o glándulas. La DM dentro sus complicaciones microvasculares tienen impactos negativos en los tejidos del SNC. El vínculo entre la DM y la enfermedad degenerativa del cerebro está bien establecida, por lo tanto se ha relacionado el deterioro cognitivo con la degeneración regional del cerebro en los pacientes diabéticos. Los centros cerebrales relacionados con el movimiento (función motora) frecuentemente emergen como afectados por el estado de la DM (Tan *et al.*, 2016), al igual que la enfermedad en las neuronas sensitivomotoras periféricas son bien reconocidas. La neuropatía periférica diabética (NPD) es causada por la

degeneración de los nervios somáticos periféricos y afecta al 30-50% de las personas con DM (Ferris *et al.*, 2020). Las complicaciones microvasculares tienen mecanismos similares independientemente del tejido; los AGE, la hiperglucemia crónica y la pérdida de la señalización de la insulina provocan una cascada de activación de la vía inflamatoria, estrés oxidativo, disfunción endotelial, así como también el envejecimiento neuronal y pérdida de neuroplasticidad. La disfunción endotelial inflamatoria y la pérdida subsecuente de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) provocan el desarrollo de lesiones microvasculares cerebrales, lo que resulta en un aumento de la carga de hiperintensidades de la sustancia blanca, infartos lacunares y microhemorragias (Erus *et al.*, 2015; Ferris *et al.*, 2020).

La DM2 es un factor de riesgo importante para el desarrollo de disfunción cognitiva y demencia. La demencia es un síndrome de deterioro cognitivo severo. En la etapa inicial la demencia es lenta en pacientes con DM, su nivel cognitivo es más bajo que el de las personas que envejecen normalmente, pero no puede cumplir con los criterios de diagnóstico para la demencia, este estado intermedio es la disfunción cognitiva leve (DCL). La DM2 no solo aumenta el riesgo de DCL, sino que también acelera la progresión de DCL a demencia, aumentando su tasa de conversión de 1.5 a 3 veces (Zhang *et al.*, 2020). Debido a que es probable que ocurran cambios en la función cerebral antes que los cambios estructurales, las funciones cerebrales pueden reflejar anomalías antes de que se produzcan cambios estructurales. La edad, la duración de la enfermedad y la regulación de la glucosa influyen en la gravedad de estos cambios estructurales (Rigoglio *et al.*, 2017).

El uso de resonancia magnética funcional en reposo en pacientes con DM ha permitido determinar la disminución de la actividad neural en el lóbulo occipital y la circunvolución postcentral relacionada con una disminución de la función cognitiva (Vinik *et al.*, 2018b). De manera que la DM afecta negativamente la estructura y función del cerebro. Los mecanismos demostrados que influyen en el envejecimiento cerebral acelerado (estructura y función) en relación con la DM incluyen; disminuciones en la actividad de la insulina, alteración de la homeostasis de la glucosa, desregulación de la función del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) e hiperleptinemia, entre otros. Los hipocampos se ven afectados por estos mecanismos patogénicos que provocan atrofia dendrítica, cambios en la formación de sinapsis, déficits electrofisiológicos, así como la aparición de histopatología similar a la enfermedad de Alzheimer (EA), como tau hiperfosforilada (Strachan y Price, 2014). Estos mecanismos en combinación con la insuficiencia microvascular y las citocinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el factor nuclear kappa B (NF-kB) son responsables,

al menos en parte, de los déficits cognitivos a menudo observados en pacientes con DM. Se ha propuesto que alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral provocan cambios de humor y la mala función de la memoria derivados de la hipo y/o hiperinsulinemia pueden producir. Los efectos de los cambios metabólicos en el cerebro que presenta la DM también pueden ser la base de un mayor riesgo de EA. Tanto los AGE como la HbA1c han sido incriminados en la atrofia cerebral. La pérdida de neuronas y la atrofia que se observa en la DM no se limita al cerebro, sino que también afecta la médula espinal (Vinik *et al.*, 2018b).

La neuropatía diabética (ND) es la complicación más común y problemática de la DM, que genera la mayor morbilidad y mortalidad en pacientes con DM, su aparición es generalmente insidiosa, y sin tratamiento el curso es crónico y progresivo. Representa más hospitalizaciones que todas las otras complicaciones diabéticas combinadas y es responsable del 50-75% de las amputaciones no traumáticas. La ND afecta los nervios periféricos o regiones solas o combinadas dentro del SNC, que conecta el cerebro y la médula espinal con el resto del cuerpo. Estos nervios controlan funciones necesarias como el movimiento, la sensación y las habilidades motoras. La ND puede estar en silencio y pasar desapercibida mientras ejerce sus estragos o puede presentarse con síntomas y signos clínicos que, aunque son inespecíficos e insidiosos con progresión lenta, también imitan a los observados en muchas otras enfermedades. La principal morbilidad asociada con la neuropatía somática es la ulceración del pie, precursora de la gangrena y la pérdida de extremidades. La ND también tiene un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes, predominantemente al causar debilidad, aumento de la fatiga, disminución de la actividad física y la movilidad, ataxia y descoordinación que predisponen a caídas, fracturas y efectos negativos en su vida social (Vinik *et al.*, 2018a). Es importante reconocer que la ND es un trastorno en el que la anomalía predominante es la pérdida de axones que, electrofisiológicamente, se traduce en una reducción de las amplitudes y no de las velocidades de conducción (Sinnreich *et al.*, 2005). La pérdida de sensación mediada por fibras pequeñas da como resultado la pérdida de la percepción térmica y del dolor, mientras que el deterioro de las fibras grandes da como resultado la pérdida de la percepción del tacto y la vibración (Vinik *et al.*, 2010).

En la DM2, la desaceleración de las velocidades de conducción nerviosa (VCN) puede ser una de las anomalías neuropáticas más tempranas y, a menudo, está presente incluso en el momento del diagnóstico (Vinik *et al.*, 2018a). Los factores causales de las ND incluyen hiperglucemia persistente, insuficiencia microvascular, estrés oxidativo, inflamatorio y nitrosativo, metabolismo de lípidos alterado,

neurotrofismo defectuoso con alteración de la regeneración de los nervios y destrucción nerviosa mediada por autoinmunidad (Fig. 8) (Ziegler *et al.*, 2014). La ND es un grupo heterogéneo de condiciones con patología muy variable, lo que sugiere diferencias en los mecanismos patogénicos para los diferentes síndromes clínicos (Vinik *et al.*, 2018a).

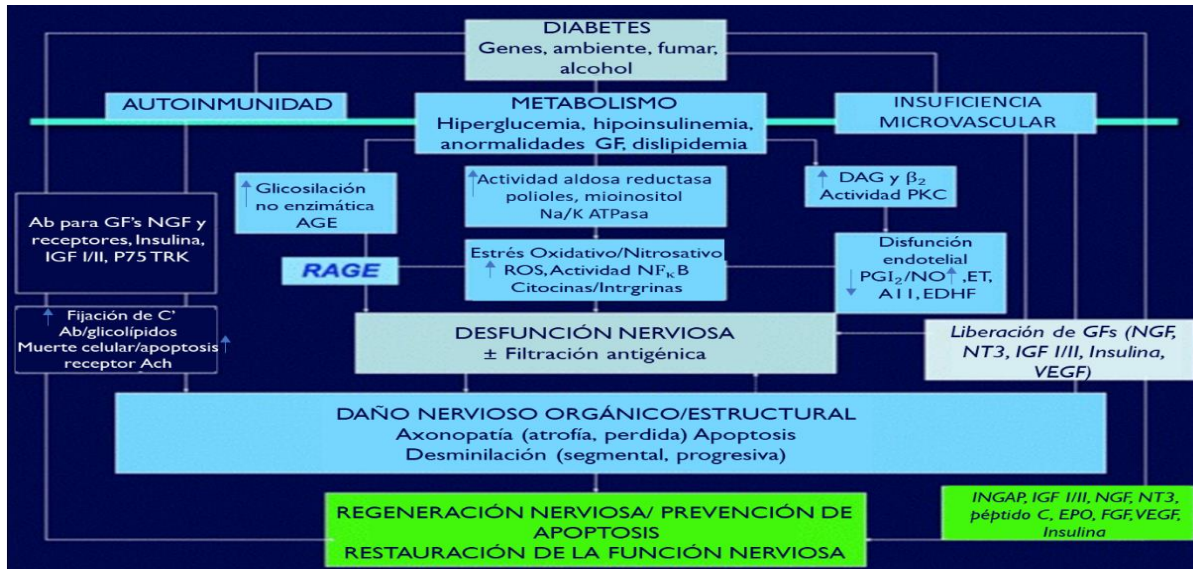


Figura 8. Patogénesis de las neuropatías diabéticas. Ab, anticuerpo; AGE, productos finales de glicosilación avanzada; C', complemento; DAG, diacilglicerol; ET, endotelina; EDHF, factor hiperpolarizante derivado del endotelio; GF, factor de crecimiento; IGF; factor de crecimiento similar a la insulina; NFκB, factor nuclear κB; NGF, factor de crecimiento nervioso; NO, óxido nítrico; NT3, neurotropina 3; PKC, proteína quinasa C; PGI2, prostaglandina I2; ROS, especies reactivas de oxígeno; TRK, tirosina quinasa (Modificado de: Vinik *et al.*, 2018a).

II.1.5.1 Alteración de la memoria y demencia

Los investigadores han notado durante mucho tiempo los efectos adversos de la DM sobre el sistema cognitivo y los trastornos de la memoria. La memoria es la retención, el registro y el proceso de recuperación de conocimientos. Todo el conocimiento adquirido a partir de la experiencia, como hechos conocidos, eventos recordados, habilidades adquiridas y aplicadas, se consideraría memoria. La memoria es el resultado de algunos eventos en la transmisión sináptica al cambiar su sensibilidad básica. El hipocampo y, en menor grado, el tálamo son responsables de decidir qué pensamientos son lo suficientemente importantes como para ser guardados como memoria (Saedi *et al.*, 2016). La demencia se clasifica principalmente en EA, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy y demencia frontotemporal. La EA es la más común, y se considera una enfermedad neurodegenerativa que con frecuencia se acompaña de lesiones cerebrovasculares (Kawamura *et al.*, 2012; Luchsinger *et al.*, 2018).

La hiperinsulinemia es un factor de riesgo plausible para la demencia de la EA, independiente de la enfermedad cerebrovascular por varias razones. La insulina puede atravesar la BHE, y las infusiones de insulina periférica en los ancianos pueden afectar los niveles de amiloide en el líquido cefalorraquídeo (LCR), un marcador indirecto del riesgo de EA. Además, los receptores de insulina en estructuras

cerebrales importantes, incluido el hipocampo y la corteza entorrinal, se ven afectados al principio de la EA. La insulina y el amiloide son sustratos que compiten por la enzima que degrada la insulina, que se ha relacionado con la eliminación de amiloide en el cerebro (Craft, 2007; Bornstein *et al.*, 2014; Luchsinger *et al.*, 2018).

La resistencia a la insulina es un elemento clave en la neurodegeneración en la DM2. La insulina se une a su receptor en la BHE y se transporta al SNC. Además, la hiperinsulinemia crónica se asocia con una regulación a la baja del receptor de insulina (RI) en la BHE, lo que disminuye los niveles de insulina cerebral (como se observa en la enfermedad de EA) conduciendo a una resistencia a la insulina y, en consecuencia, desencadena o acelera el proceso de envejecimiento neural y neurodegeneración. Además, tanto la hiperglucemia como la resistencia a la insulina provocan daño a la BHE que juega un papel importante en los trastornos del SNC dependientes de DM, ya que como se ha mencionado podría aumentar la permeabilidad de la BHE, cambiar la integridad y la permeabilidad de la misma (Verdile *et al.*, 2015; Saedi *et al.*, 2016). La prevalencia de EA puede ser mayor en pacientes con DM ya que los científicos consideran un papel clave el estrés oxidativo en el desarrollo de la EA. La DM contribuye al desarrollo de la EA al favorecer la hiperfosforilación de la proteína tau y la acumulación de la proteína β -amiloide ($A\beta$), el aumento y daño del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Butterfield *et al.*, 2014).

Desde un punto de vista molecular, la falta de interacción entre la insulina y el RI se asocia a un aumento de la fosforilación inhibidora sobre el sustrato del RI, que a su vez, impacta negativamente en las dos principales cascadas de señalización mediada por insulina; las vías PI3K y MAPK, ambas involucradas en el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la respuesta al estrés celular. La desactivación de la señalización de la insulina da como resultado un transporte y metabolismo de glucosa deficiente, lo que promueve una alteración de los procesos mitocondriales involucrados en la producción de energía (ATP), que a su vez, conduce a un círculo vicioso en el que la producción de energía reducida se asocia con un aumento de las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) responsables del daño oxidativo/nitrosativo de las mitocondrias (en parte por daño al ADN mitocondrial y la sobreactivación de la cadena de electrones que resulta en la sobreproducción de ROS) y otros componentes celulares. Además, el aumento de la producción y acumulación de $A\beta$, que representa una característica clave de la patología de la EA, esto también promueve el deterioro mitocondrial. La disfunción mitocondrial también es un importante desencadenante de la formación de inflamomas. Las deficiencias asociadas

a la resistencia a la insulina en la captación y utilización de glucosa están asociadas con un aumento del estrés del retículo endoplásmico (RE), que desregulan el metabolismo de los lípidos, provocando la acumulación de lípidos tóxicos en el cerebro. Todos estos eventos contribuyen al aumento de los niveles de estrés oxidativo responsable de la neurodegeneración que se observa en el cerebro con EA. Aunque la resistencia a la insulina y la producción de A β pueden considerarse causas principales del aumento del estrés oxidativo, este último, a su vez, promueve la fosforilación de RI, así como el daño oxidativo de las proteínas involucradas en la glucólisis, el ciclo de Krebs y la síntesis de ATP. Finalmente, debido a que la resistencia a la insulina se asocia con una mayor producción de A β , se postula que la producción de A β es responsable del inicio de la resistencia a la insulina, queda por aclarar si la resistencia a la insulina es una causa, una consecuencia o respuesta compensatoria a la neurodegeneración inducida por A β (Fig. 9) (Saedi *et al.*, 2016; Bahramsoltani *et al.*, 2021).

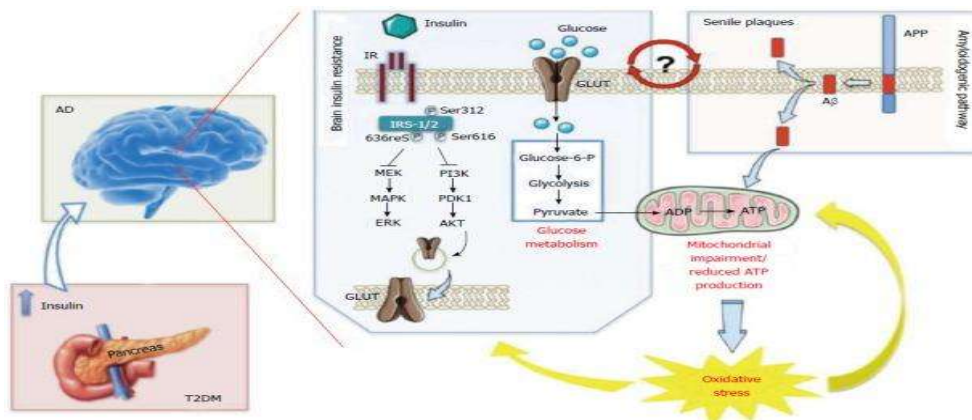


Figura 9. Mecanismo de aumento de estrés oxidativo que impulsa la resistencia a la insulina en el cerebro con DM. ADP: Difosfato de adenosina; APP: proteína precursora de β -amiloide; ATP: trifosfato de adenosina; AKT: Akt también conocida como proteína quinasa B (PKB); ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; GLUT: transportador de glucosa; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; MEK: MAPK / Erk quinasa; PDK1: proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido; PI3K: fosfoinositido 3 quinasa (Saedi *et al.*, 2016).

II.1.5.2 Deterioro cognitivo y alteraciones en el aprendizaje

La cognición se define como la acción o proceso mental de adquirir conocimiento y comprensión a través del pensamiento, la experiencia y los sentidos. Las anomalías del metabolismo de la glucosa, pueden ser causas de deterioro cognitivo (Kawamura *et al.*, 2012). El aumento en la prevalencia de DM junto con el envejecimiento de la población puede resultar en un gran aumento de deterioro cognitivo en personas con DM. La asociación de DM y deterioro cognitivo puede reflejar un efecto directo de la hiperglucemia sobre el cerebro o los efectos de las comorbilidades asociadas a la DM (Fig. 10) (Bornstein *et al.*, 2014; Luchsinger *et al.*, 2018). Se sabe que la DM y sus afecciones relacionadas, la adiposidad y la

hiperinsulinemia, y su agrupación con otros factores de riesgo vascular, como hipertensión y dislipidemia, aumentan el riesgo de enfermedad cerebrovascular (Boden *et al.*, 2008).

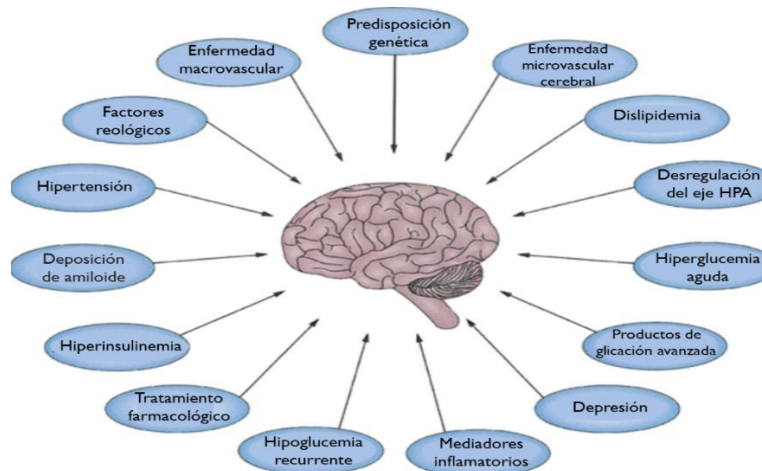


Figura 10. Numerosos mediadores potenciales del deterioro cognitivo en pacientes con DM. (Modificado de: Strachan y Price 2014).

Se ha informado daño a muchos dominios de la función cognitiva en pacientes diabéticos, aspectos como el procesamiento de la información, la eficiencia psicomotora, la atención, la construcción visual, la flexibilidad mental, la velocidad psicomotora, vocabulario, praxis visuoespacial, la función ejecutiva, así como la memoria, se ven gravemente afectados en la DM, existiendo diferencias entre la DM1 y DM2 como se muestra en la tabla 2 (Roriz *et al.*, 2009). Como resultado, se reduce la velocidad de la marcha, se deteriora el equilibrio, aumenta el riesgo de caídas y las fracturas son más frecuentes en los pacientes diabéticos de edad avanzada, lo que reduce la calidad de vida además de provocar atrofia del hipocampo, que está relacionada con la memoria (Kawamura *et al.*, 2012).

La hiperglucemia tiene efectos nocivos sobre las neuronas y el daño neuronal es la base del deterioro cognitivo. Los cambios neuronales como resultado de la producción de AGE's y el estrés oxidativo se han citado como factores directamente relacionados en el proceso por el cual la hiperglucemia causa daño funcional. El estrés osmótico inducido por la hiperglicemia provoca daño a las neuronas y al endotelio vascular alterando la BHE provocando una fuga local de sustancias vasculares, lo que conduce a un mayor daño neuronal (Biessels y Reijmer, 2014). Además, la hiperglucemia podría alterar el transporte de sustratos, la homeostasis del lactato, la dendritogénesis y el ciclo glutamato/glutamina en el hipocampo en desarrollo, lo que provocaría déficits cognitivos (Kawamura *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2020).

Como se mencionó anteriormente la hiperinsulinemia prolongada altera la respuesta de la insulina por la disminución de sus receptores en la BHE y cerebro, inhibiendo la transferencia de insulina al LCR y los tejidos cerebrales. Estos cambios crean defectos en el aprendizaje y la formación de la memoria ligados al deterioro cognitivo. Además, la hiperglucemia promueve la apoptosis al desencadenar la acumulación de ROS y calcio intracelular en las neuronas, además de elevar la concentración de ácido láctico, un producto de la vía anaeróbica que desencadena el estrés en el cerebro (Demir *et al.*, 2021). La DM es una de las principales causas de la enfermedad neurodegenerativa conocida como encefalopatía diabética, como disfunción cognitiva, demencia, enfermedad mental y otros síntomas cerebrales crónicos. El riesgo de los pacientes con DM es 1.5 veces mayor a desarrollar deterioro cognitivo en comparación de los sujetos normales. Las principales manifestaciones clínicas de disfunción cognitiva leve a moderada son deterioro de la capacidad de aprendizaje y memoria, envejecimiento cerebral y EA, presentado en humanos y modelos experimentales (Grimmig *et al.*, 2017). Las puntuaciones más bajas en la función cognitiva global se han reconocido como una complicación grave de la DM en los pacientes. Los mecanismos moleculares intracelulares *in vivo* precisos que subyacen a los déficits en el aprendizaje y la memoria mediados por la DM no se han dilucidado por completo. Los receptores de glutamato de N-metil-d-aspartato (NMDA) (AMPA/NMDAR) son los receptores predominantes en la mediación de las actividades neurales avanzadas como la comunicación neuronal básica, la búsqueda de rutas axonales, la regulación del estado de ánimo y la formación de la memoria. Las alteraciones moleculares por la DM en las subunidades NMDAR pueden afectar los procesos fisiológicos y patológicos en el hipocampo. La potenciación a largo plazo dependiente de NMDAR (LTP) es el principal mecanismo celular que se cree que subyace al aprendizaje espacial y la memoria en el hipocampo (Can *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

Funciones cognitivas	T1DM	T2DM
Memoria verbal	↓	↓ *
Memoria no verbal	↓	↓ *
Atención	↓ *	↓
Rendimiento visuoespacial	↓ *	—
Velocidad de procesamiento	↓ *	↓ *
Función ejecutiva	↓ *	↓ *
Eficiencia psicomotora	↓ *	—
Inteligencia general	↓	—

Tabla 2. Resumen de las funciones cognitivas que se encuentran afectadas en la DM1 y DM2. ↓: Función disminuida; - no parece estar afectado o faltan pruebas. Los marcados con asteriscos (*) son datos particularmente sólidos (Roriz *et al.*, 2009).

II.1.5.3 Pérdida encefálica

Los estudios en adultos con DM muestran reducciones regionales en el volumen cerebral (Fig. 11). Las reducciones de volumen cerebral en adultos con DM1 son más evidentes en los dominios de inteligencia general, velocidad psicomotora, flexibilidad mental, entre otras mencionadas en la tabla 2. Así como, también se han observado reducciones modestas en personas con DM2 en todos los grupos de edad, las cuales también se describen en la tabla 2. Sin embargo, en las personas mayores, especialmente mayores de 65 años, la DM2 se asocia con formas más graves de deterioro cognitivo (Biessels *et al.*, 2014).

Los estudios en adultos (20 a 60 años) con DM han utilizado métodos de segmentación automatizados para demostrar reducciones modestas en el volumen cerebral en comparación con sujetos control. Un estudio informó una reducción general del 7% en el volumen de materia gris (Hughes *et al.*, 2013), así como dentro del frontal, posterior y corteza temporal y en materia gris subcortical. Estudios han relacionado directamente las alteraciones del volumen cerebral con el funcionamiento cognitivo, provocando la desaceleración de la velocidad de procesamiento de la información, la reducción de la atención, puntuaciones más bajas de las subpruebas de coeficiente intelectual, un control metabólico deficiente, reflejado por la hiperglucemia crónica, mayor resistencia a la insulina, eventos hipoglucémicos y mayor duración de la enfermedad, lo que sugiere que la exposición a largo plazo a los factores de riesgo relacionados con la DM es especialmente dañina para el cerebro (Biessels y Reijmer, 2014). Esto puede deberse a la interacción de la DM con procesos como la poda y el crecimiento neuronales, lo que da como resultado regiones de volumen cerebral tanto disminuido como aumentado (Marzelli *et al.*, 2014). La reducción en el volumen cerebral es comparable con 3-5 años de envejecimiento normal, siendo hasta tres veces más que la tasa de atrofia del envejecimiento normal. La pérdida de tejido cerebral se refleja más claramente en la expansión acelerada de los ventrículos, lo que indica que la atrofia asociada a la DM2 es más pronunciada en las regiones que rodean los ventrículos (como el hipocampo). En conclusión, la DM1 y la DM2 están asociadas con alteraciones en el volumen cerebral (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; 2014; Biessels y Reijmer, 2014).

Dada la asociación entre la DM y la enfermedad de EA, se ha prestado mucha atención al hipocampo. Se ha reportado una reducción del volumen del hipocampo en pacientes con DM2. Los procesos patológicos que conducen a la atrofia cerebral no necesariamente indican pérdida neuronal, ya que la pérdida de axones y células gliales, la rarefacción y encogimiento de la sustancia blanca, la arteriolosclerosis y la colagenosis venosa pueden producir cambios en el volumen cerebral. Las anomalías encontradas en la

resonancia magnética cerebral que se asocian con la DM2 incluyen atrofia cortical y subcortical global, y una mayor carga de marcadores de enfermedad de vasos pequeños (SVD), en particular infartos lacunares (Fig. 11). Es probable que la SVD contribuya a anomalías en la conectividad funcional y estructural, que es otra característica de la resonancia magnética de la DM2 que está claramente relacionada con la disfunción cognitiva (Biessels y Reijmer, 2014; Musen *et al.*, 2018).

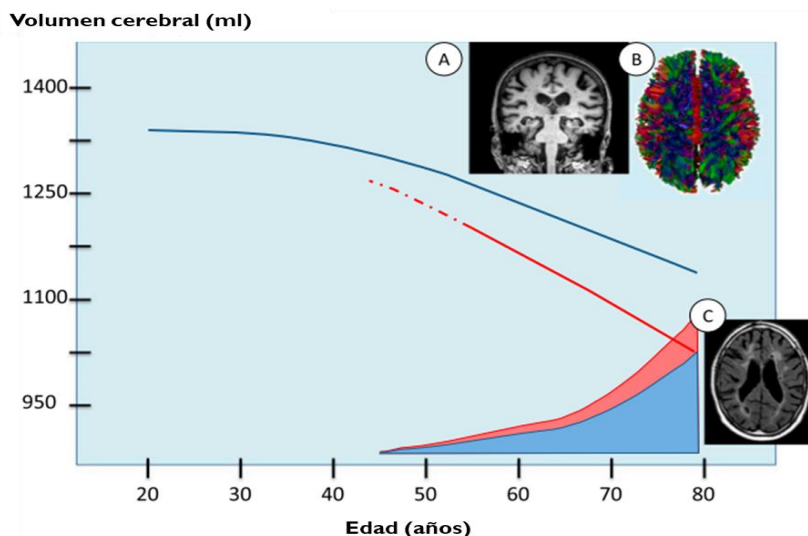


Figura 11. Trayectorias de anomalías en la resonancia magnética cerebral en pacientes con DM2. La DM2 se asocia con atrofia cerebral (línea azul, evolución de los volúmenes cerebrales con la edad en la población general; línea roja, trayectorias estimadas para la DM2). (A), pérdida de conectividad (B) y una mayor carga de SVD (área sombreada en azul, SVD en población general con edad; área roja, SVD en pacientes con DM2) (C). Anomalías en la resonancia magnética cerebral desde estadios prediabéticos (línea punteada roja), probablemente bajo la influencia de un perfil de factor de riesgo vascular adverso (Modificado de: Biessels y Reijmer, 2014).

II.1.6. Descripción del hipocampo

El hipocampo es una elevación convexa de tejido de materia gris dentro de la circunvolución parahipocámpal dentro del cuerno temporal inferior del ventrículo lateral. Se puede describir de manera más general como una hoja curva y recurvada de la corteza que se pliega en la superficie medial del lóbulo temporal. El hipocampo tiene tres zonas distintas: la circunvolución dentada o giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho o Cornu Ammonis (CA) y el subículo (Fig. 12 A); el GD y el hipocampo forman dos anillos en forma de C que se entrelazan. El subículo es una zona de transición, que une a CA con el GD. La circunvolución parahipocámpal y los surcos cingulados se encuentran en la superficie medial del hemisferio. Este hipocampo de cinco centímetros de largo (desde el extremo anterior de la amígdala hasta el extremo posterior cerca del esplenio del cuerpo calloso) se divide en cabeza, cuerpo y cola. El alveus, que es la superficie del hipocampo, está cubierto por el endimario dentro de la cavidad ventricular. El hipocampo contiene partes como la fimbria, el pilar, el cuerpo y la columna; las fimbrias

se forman donde las fibras alveus convergen a lo largo de la porción medial del cuerno inferior del ventrículo lateral. CA es una estructura parecida a un caballito de mar o un cuerno de carnero que describe las diferentes capas del hipocampo (Fogwe *et al.*, 2021).

Estructuralmente, el hipocampo se divide en dos partes entrelazadas, la región CA y GD (Foghi y Ahmadpour, 2013). La parte CA, histológicamente en el hipocampo, se divide en cuatro secciones: CA1, CA2, CA3 y CA4. El GD tiene tres capas, tales como (1) la capa granular que contiene los cuerpos celulares densamente empaquetados de las células granulares, (2) la capa molecular formada por las dendritas apicales entrelazadas de las células granulares y sus aferentes, y (3) la capa plexiforme ubicada en el hilio de la circunvolución dentada que contiene los segmentos iniciales de los axones de células granulares a medida que se juntan para formar el haz de fibras musgosas glutamatérgicas. El hipocampo propiamente dicho como estructura arqueocortical se ha dividido en varias capas de la siguiente manera: (1) El alveus; que contiene los axones de las células piramidales, (2) el stratum oriens, una capa entre el alveus y los cuerpos celulares piramidales que contiene las dendritas basales de las células piramidales, (3) el estrato piramidal, (4) el stratum radiatum, y (5) el estrato lacunosum/molecular, que son los segmentos proximal y distal del árbol dendrítico apical, respectivamente (Sadeghi *et al.*, 2016).

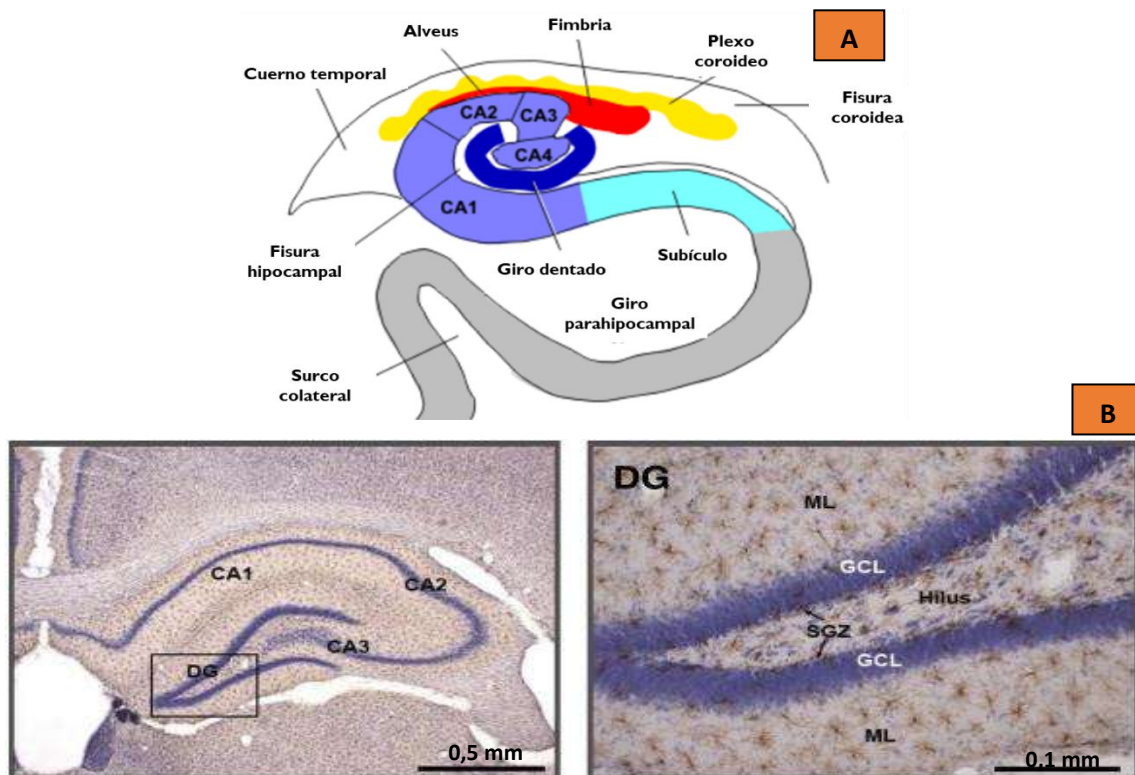


Figura 12. Anatomía del hipocampo. (A) Anatomía y zonas del hipocampo. (B) Giro dentado del hipocampo (DG) de rata y acercamiento a la zona subgranular (SGZ). Inmunomarcaje utilizando la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1)/tinción de Nissl (A Modificada de: Hesselink, 2011; B Modificada de Liaury *et al.*, 2012).

El hipocampo es una estructura pareada que forma parte central y crucial del sistema límbico (límbico-cognitivo) (Fig. 13), que juega un papel fundamental en la formación de la memoria, aprendizaje espacial, comportamientos emocionales, adaptativos y reproductivos, también es particularmente importante en la formación de nuevos recuerdos y la conexión de emociones y los sentidos, como el olfato y el sonido a los recuerdos. El hipocampo actúa como un indicador de memoria enviando los recuerdos a la parte apropiada del hemisferio cerebral para su almacenamiento a largo plazo y recuperándolos cuando sea necesario (Sadeghi *et al.*, 2016), haciéndolo un sitio para la toma de decisiones. Así, cuenta con un mecanismo para convertir la memoria de corto plazo en memoria a largo plazo, consolidando el pensamiento verbal y simbólico en información a la que se puede acceder cuando sea necesario para la toma de decisiones. Las tres fases de la memoria incluyen registro, almacenamiento y recuperación de información (Fogwe *et al.*, 2021). Funcionalmente, el hipocampo está segmentado en partes dorsal y ventral. El ventral (anterior en primates) se relaciona con el estrés, la emoción y el afecto. El hipocampo dorsal (posterior en los primates) se correlaciona con las regiones corticales involucradas en el procesamiento de la información. La complejidad estructural del hipocampo lo hace vulnerable a muchos trastornos metabólicos como la diabetes mellitus (Foghi y Ahmadpour, 2013).

Dentro del cerebro las regiones capaces de formar nuevas células nerviosas (neurogénesis) se conocen como “nichos neurogénicos”, existen dos regiones anatómicas: la zona subventricular (SVZ) con sus ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) del GD del hipocampo (Ho *et al.*, 2013; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; 2014) (Fig. 13), con una alta presencia de células madre. La neurogénesis es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas en el SNC, además de mantener la homeostasis neural y es esta capacidad de auto regeneración del cerebro adulto, que ha despertado un gran interés por las potenciales aplicaciones terapéuticas en diversas lesiones neurológicas (Camacho *et al.*, 2020). Durante décadas, se creyó que la neurogénesis solo ocurría durante las etapas embrionarias en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, pero se ha reconocido que la neurogénesis adulta replica el complejo proceso de desarrollo neuronal para generar nuevas neuronas integradas funcionalmente (Fig. 13) (Overstreet y Westbrook, 2006; Sasikumar *et al.*, 2022). Se ha propuesto que una subpoblación de células que expresan proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en esta región son las células madre/progenitoras neurales multipotentes (NSC) residentes. Estas NSC proliferan y dan lugar a nuevas células granulares a través de cinco etapas de desarrollo; proliferación, especificación del destino, migración, orientación axón/dendrita e integración sináptica (Kitabatake *et al.*, 2007; Sasikumar *et al.*, 2022).

En la figura 13 se muestra la incorporación de neurogénesis del GD. La neurogénesis en el hipocampo ocurre en la zona subgranular (SGZ) (Fig. 12 B) del GD, donde residen las células progenitoras neurales. Dentro de la primera semana después del nacimiento, estos progenitores se someten a una elección de destino, que en este caso, es para convertirse en una neurona inmadura con neuritas en desarrollo (Zhao *et al.*, 2006). Los axones de estas nuevas neuronas granulares son guiados a través del hilio del GD, con ramas de larga distancia dirigidas al CA3 y las dendritas que se extienden hacia la capa molecular. Después de 3 a 4 semanas, estas células forman un fenotipo maduro, con sus dendritas que contienen espinas que reciben información principalmente de la corteza entorrinal (EC) a través de la vía perforante y sus axones altamente ramificados que salen a las neuronas piramidales CA3 y células musgosas hiliares (MC) a través de la vía de la fibra musgosa. Continuando con el circuito del hipocampo, las neuronas piramidales CA3 salen a las neuronas piramidales ipsolaterales CA1 a través de la vía colateral de Schaffer o contralateralmente a través de la vía comisural asociativa. Las neuronas piramidales CA1 emiten a las neuronas piramidales del subículo (SB), que emiten a la EC, y estas neuronas finalmente salen a la corteza parahipocampal y perirrinal. En última instancia, los circuitos se conectan a las cortezas de asociación, desarrollando así el aprendizaje en el hipocampo (Kitabatake *et al.*, 2007). La neurogénesis del hipocampo adulto parece originarse a partir de una célula precursora similar a un astrocito que da lugar a una célula progenitora que se amplifica transitoriamente. En esta etapa se encuentran los primeros indicios de determinación neuronal. Las células reciben, por ejemplo, su primera entrada sináptica, que es GABAérgica (Plümpe *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2013).

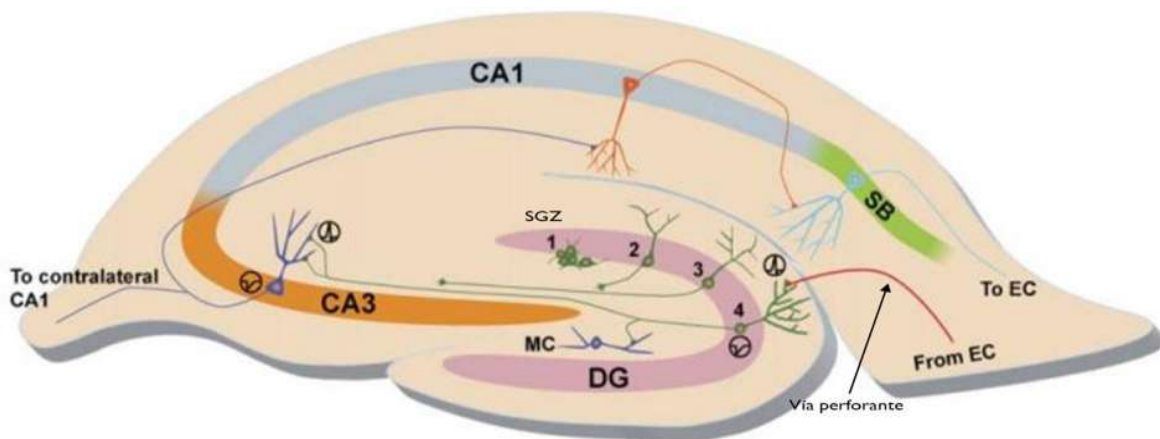


Figura 13. Incorporación de neurogénesis de neuronas del Giro dentado (DG). (1) Zona residen las células progenitoras neurales. (2) Célula progenitora convertida a neurona inmadura, está neurona inmadura presenta neuritas en desarrollo. (3) Los axones de las nuevas neuronas granulares son guiados a través del hilio del DG, con ramas de larga distancia al CA3 y las dendritas que se extienden hacia la capa molecular. 3 o 4 semanas después, estas células maduras, reciben información de la corteza entorrinal (EC) a través de la vía perforante (axón rojo) (4) y células musgosas hiliares (MC) a través de la vía de la fibra musgosa (axón verde). Continuando con el circuito del hipocampo, las neuronas piramidales CA3 salen a las neuronas piramidales ipsolaterales CA1 a través de la vía colateral de Schaffer o contralateralmente a través de la vía

comisural asociativa (axón azul). Las neuronas piramidales CA1 (axón naranja) emiten a las neuronas piramidales del subículo (SB) (axón cian), que emiten a las células hacia la EC, saliendo finalmente a la corteza parahipocampal y perirral (Modificado de: Kitabatake *et al.*, 2007).

La neurogénesis adulta en el cerebro humano se descubrió mediante la utilización de metodologías importadas directamente de la investigación con roedores, como la detección inmunohistológica de proliferación y biomarcadores específicos de tipo celular en tejido de biopsia o post mórtem. Un ejemplo de ellos es la bromodesoxiuridina (BrdU) un análogo de la timina que se usa ampliamente en modelos animales para cuantificar el número de células en división en un tejido y rastrear su progenie. Cuando se administra sistémicamente, se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular sustituyendo a la timina y se transmite a las células hijas, siempre que no se diluya a través de muchas rondas de proliferación. Usando una variedad de anticuerpos anti-BrdU específicos, puede detectarse mediante inmunohistoquímica. La principal ventaja del marcaje con BrdU es su sensibilidad para detectar células en proliferación en comparación con otros métodos inmunohistológicos. Otra ventaja es la utilización del análisis de pulso y seguimiento, que permite realizar estudios tanto de proliferación (horas después de la inyección de BrdU) como de diferenciación (días o meses después de la inyección de BrdU) (Sierra *et al.*, 2011).

Otro marcador utilizado para la detección inmunohistológica y que las células recién generadas también comienzan a expresar es doble cortina (DCX). DCX (también conocida como lisencefalina-X) es una proteína codificada por el gen DCX, asociada a los microtúbulos del citoesqueleto que se expresa en las células precursoras neurales y neuronas inmaduras. DCX se presenta aproximadamente al cuarto día, funcionalmente se ha relacionado con la estabilización de los microtúbulos causando su agregación, la migración celular y diferenciación neuronal, entre otros posibles aspectos de la maduración, incluida la sinaptogénesis. Debido a que DCX se localiza en el citoplasma de las neuronas inmaduras, su morfología se vuelve apreciable en estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos contra DCX. En el GD, DCX solo se expresa en células que contribuyen a la neurogénesis, es por eso que DCX es utilizada como marcador de la neurogénesis (Horesh *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2003; Couillard *et al.*, 2005; Plümpe *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2015; Ghibaudi y Bonfanti, 2022).

La renovación neuronal es necesaria para la formación de la memoria (Kitamura y Inokuchi, 2014). Cualquier factor que altere el equilibrio entre la proliferación / muerte neuronal puede resultar en un deterioro de la memoria y el aprendizaje. Los estudios han demostrado que la DM experimental causa una disminución de las células granulares, proliferación y muerte neuronal (necrosis / apoptosis) en CA1-

CA3 y regiones de GD (Zhang *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2009; Ahmadpour *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2016; Escamilla, 2019). En esta línea, Li y colaboradores, reportaron muerte neuronal hipocampal en un modelo de rata con DM, acompañada de algunas alteraciones cognitivas funcionales luego de un largo período de DM (8 meses). Donde se considero la muerte neuronal como la principal causa de ND del SNC y periféricas (Li *et al.*, 2002).

II.1.6.1 Cambios morfológicos del hipocampo en diabetes mellitus

La DM, independientemente de su tipo, se asocia con alteraciones cerebrales en modelos humanos y animales de la enfermedad, lo que conlleva a la disminución de la plasticidad sináptica del hipocampo, neurotoxicidad y cambios en la neurotransmisión del glutamato. Los déficits en la plasticidad y la cognición del hipocampo se asociaron con un aumento de los niveles circulantes de corticosterona junto con deficiencias en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células del hipocampo (Balu y Lucki, 2009; Park *et al.*, 2021).

Entre las regiones del SNC, el hipocampo es la región más sensible a la DM. Además, se han informado anomalías electrofisiológicas, proliferación celular suprimida y apoptosis en el GD relacionada con la neuropatía en la DM, también se ha mostrado que la DM inducida por estreptozotocina (STZ) acelera la formación de neuronas oscuras en CA3 y el GD (Foghi y Ahmadpour, 2013; Ye *et al.*, 2021). Estas alteraciones son causadas por la hipo/hiperglucemia aguda o severa y accidente cerebrovascular y se conocen como encefalopatía diabética, un término que abarca deterioro funcional de la cognición, conducción de señales cerebrales, neurotransmisión, plasticidad sináptica y patología estructural asociada con la DM. Debido a estos cambios en el hipocampo los pacientes diabéticos pueden tener deficiencias en el aprendizaje y la memoria, resolución de problemas, velocidad mental y motora (Ma *et al.*, 2015).

Los efectos crónicos o relacionados con la duración de la DM en el cerebro se manifiestan en todos los niveles del SNC desde el nivel microscópico hasta el macroscópico. Los estudios de neuroimagen macroscópicamente han demostrado una alta incidencia de anomalías como la disminución del volumen de materia blanca en la circunvolución parahipocampal, lóbulos temporales y frontales, así como en el hipocampo, la corteza insular, las circunvoluciones temporal superior, media y frontal (Sadeghi *et al.*, 2016). En modelos experimentales de DM, se ha informado de un amplio espectro de cambios neuronales, como alteraciones sinápticas y neuronales, degeneración, aumento de la permeabilidad microvascular cerebral y pérdida neuronal que, en conjunto, pueden conducir a deterioro cognitivo y

mayor riesgo de desarrollo de demencia (Sridhar *et al.*, 2015). En resumen, la DM se asocia con una "encefalopatía" caracterizada por deficiencias cognitivas prominentes, de progresión lenta, acompañada de trastornos neurofisiológicos y estructurales del cerebro (Sadeghi *et al.*, 2016).

II.1.7. Polifenoles: síntesis, absorción y efecto en el metabolismo de glucosa en la enfermedad de DM

Los polifenoles son fitoquímicos abundantes en las fuentes naturales de alimentos vegetales así como en frutas, nueces, cereales, bebidas, legumbres, especias, té, café, vino tinto y muchos otros y representan componentes importantes de la dieta humana, además, poseen numerosas actividades biológicas, como antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, antialérgicas, vasodilatadoras, anticancerígenas, neuroprotectores, antidiabéticas y mejoran las actividades de inmunidad en el cuerpo (Fig. 14 A). Los polifenoles son relativamente abundantes en la dieta humana en varios alimentos y bebidas, donde pueden aportar más de 1 mg de contenido polifenólico por ración (Silva y Pogačnik, 2020). Existen más de 8,000 polifenoles diferentes con diversas bioactividades que se clasifican en subclases, donde los criterios de inclusión en cada grupo pueden ser la fuente, la función biológica o la estructura química (Zhang *et al.*, 2020). Los polifenoles son metabolitos secundarios que protegen a las plantas de la radiación ultravioleta, el estrés oxidativo y algunos herbívoros, pero también para atraer insectos polinizadores. Estructuralmente, se caracterizan por la presencia de uno o más anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilo. La mayoría de ellos se caracterizan por la presencia de dos anillos aromáticos de benceno (anillos A y B) unidos por un anillo piránico (anillo C) y, según el grado de oxidación del anillo piránico (Fig. 14 B), se pueden clasificar en 6 subclases: flavonoles, flavanoles, isoflavanos, flavanonas, flavonas y antocianinas. Aunque también existen los ácidos fenólicos, estilbenos, curcuminoides y lignanos. Los flavonoides constituyen la clase más grande de polifenoles, e incluyen casi la mitad de todos los compuestos fenólicos identificados hasta el momento. Los flavonoides naturales en los alimentos generalmente existen como glucósidos (unidos a uno o más azúcares) (Silveira *et al.*, 2019; Leclerc *et al.*, 2021). En los alimentos, los polifenoles pueden contribuir al amargor, la astringencia, el color, el sabor, el olor y la estabilidad oxidativa. La distribución de fenoles en las plantas a nivel tisular, celular y subcelular no es uniforme. Diversos factores afectan el contenido de polifenoles en las plantas, estos incluyen el grado de madurez en el momento de la cosecha, factores ambientales, procesamiento y almacenamiento., así como por factores ambientales y edáficos como el tipo de suelo, la exposición al Sol, la lluvia, etc. (Pandey y Rizvi 2009; Yang *et al.*, 2018).



Figura 14. Síntesis, clasificación y efectos en la salud de los polifenoles. (A) La síntesis de polifenoles requiere de la fotosíntesis y de la vía del shikimato. Los polifenoles se absorben a través del intestino y el colón con ayuda del microbioma para generar sus diferentes efectos en el cuerpo. (B) Estructura general de los polifenoles (Modificado de Orozco *et al.*, 2019; Modificado de: Silveira *et al.*, 2019).

El proceso de generación de metabolitos secundarios requiere de la fotosíntesis y comienza en la vía del shikimato, que es una vía ubicua en las plantas, así como también requiere de la vía del malonato (Fig. 15 A). La vía del shikimato produce tres aminoácidos aromáticos esenciales: L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina, que la planta utiliza para sintetizar proteínas que son cruciales para el crecimiento, la generación de pigmentos, hormonas y compuestos aromáticos complejos (alcaloides, fenilpropanoides, flavonoides) y la producción de componentes de la pared celular. La vía del malonato produce taninos y lignanos condensados a través de reacciones de polimerización. Durante la fotosíntesis, las vías de las pentosas fosfato forman compuestos metabólicos primarios, como el fosfoenolpiruvato (PEP) y el D-eritrosa-4-fosfato (E-4-P). La enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato (DAHP sintasa) conduce a la formación de shikimato. Luego, por reacciones de desfosforilación, se forma el metabolito corismato, que actúa como iniciador en la síntesis de aminoácidos aromáticos. A partir del corismato se producen dos metabolitos, el antranilato precursor del triptófano y el prefenato precursor de la fenilalanina y la tirosina (Fig. 15 A). A través de la vía del shikimato el triptófano, la fenilalanina y la tirosina catabolizan a los compuestos fenólicos. Los terpenos y los terpenoides se derivan de un precursor común, el difosfato de isopentenilo (IPP), que se ubiquitina a lo largo de la vía del mevalonato precursor del metabolito primario Acetyl-CoA. Los compuestos que contienen N son derivados de aminoácidos alifáticos como los alcaloides a través del ciclo de Krebs (Fig. 15 B) (Orozco *et al.*, 2019).

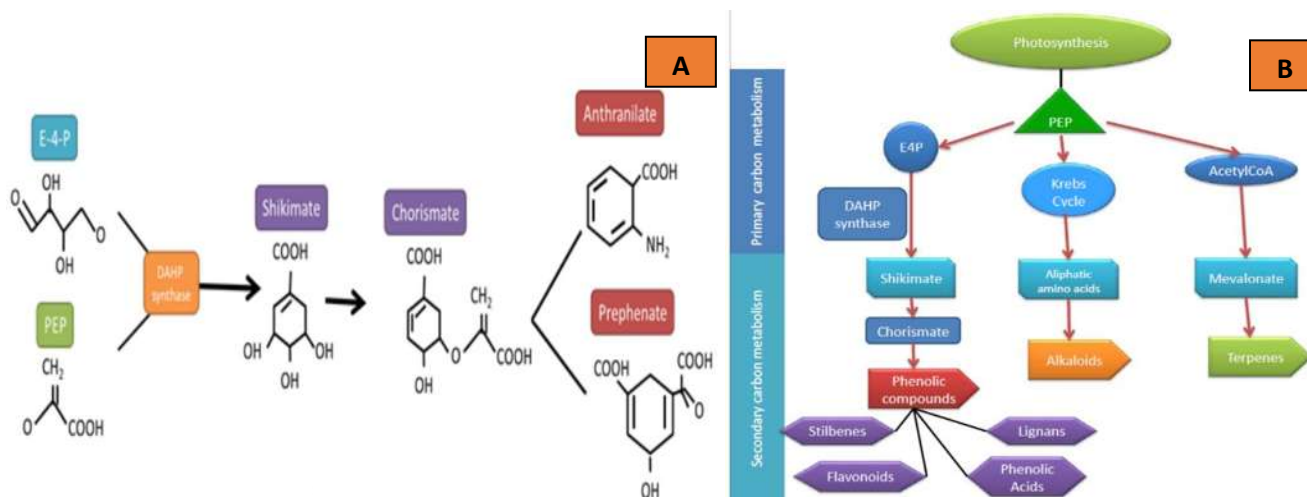


Figura 15. Representación esquemática de la formación de precursores de los compuestos secundarios a través de la vía del Shikimate. (Modificado de Orozco *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos de los alimentos se encuentran en forma de ésteres, glucósidos, polímeros o agliconas, por lo que necesitan ser hidrolizados para su absorción, ya que la absorción se ve afectada por la estructura química, el grado de glicosilación, la circulación enterohepática y el porcentaje de polifenoles que llega al colon. Los polifenoles se metabolizan en dos fases: En la fase I se produce oxidación, reducción e hidrólisis, causando una reducción del número de grupos hidroxilo, añadiendo a la estructura sulfato (por la enzima sulfotransferasa, *SULT*), ácido glucurónico (por la enzima uridina-5-difosfato-glucuronosiltransferasa, *UDP-glucosa*) o grupos metilo (por la catecol-O-metiltransferasa, *COMT*), modificando el compuesto y favoreciendo un aumento de polaridad y su propiedad hidrofílica. De esta manera los polifenoles son más solubles, favoreciendo su excreción a través de la orina. La digestión de los polifenoles se inicia desde la boca, donde el proceso de masticación y la secreción de saliva, así como la microbiota, tienen actividad β -glucosidasa, reduciéndolos a formas más simples (Dueñas *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2022). En el estómago, los glucósidos no son absorbidos ya que resisten a las secreciones gástricas, aunque hay reportes de que algunos compuestos como la quercetina y las antocianinas pueden ser absorbidos. Los polifenoles ingeridos llegan al colon, donde la microbiota y enzimas intestinales reaccionan para producir agliconas (compuesto sin azúcares que queda tras reemplazar por un átomo de hidrógeno el grupo glucosilo de un glucósido), las cuales facilitan la absorción y tienen mayor actividad fisiológica de sus precursores alimentarios. El porcentaje de polifenoles de la dieta que se absorben en la zona intestinal es el 5-10%, los restantes del 90-95% llegan al colon donde son absorbidos, las enzimas involucradas son la β -glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa (ruptura de la lactosa a galactosa y glucosa) ubicada en la membrana del enterocito (Fig. 16).

Los polifenoles en forma de agliconas son absorbidos en los enterocitos por el transportador activo de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) y luego hidrolizados por una β -glucosidasa citosólica. Cuando un polifenol llega al intestino en su forma monomérica o como estructura dimérica, se absorbe por difusión pasiva al interior del enterocito debido a su propiedad lipofílica (Orozco *et al.*, 2019), cuando los polifenoles llegan al colon en formas más complejas como los polifenoles oligoméricos y poliméricos son degradados por la microbiota intestinal (Teng y Cheng, 2019). Debido a estas modificaciones, es que las formas de polifenoles en plasma son diferentes a las encontradas en sus fuentes (Orozco *et al.*, 2019).

La segunda fase o fase de conjugación, tiene lugar en los enterocitos (células del intestino delgado) o hepatocitos que llegan a través de la vena porta, donde los polifenoles hidrolizados (agliconas) se conjugan con derivados del metilo, glucurónido y sulfato que después son liberados a la circulación para su distribución a los órganos y posterior excreción por la orina, heces o bilis, los polifenoles circulan en la sangre unidos a proteínas, en particular, la albúmina que es la principal proteína responsable de la unión. Posteriormente, los metabolitos llegan a la periferia, unidos a las proteínas plasmáticas (albúmina), circulan en la sangre, por lo tanto, el compuesto puede ingresar a los tejidos (hepático, estomacal, intestinal y nefrótico) donde es metabolizado o transportado a los tejidos diana (pulmonar, pancreático, cerebral, cardíaco y esplénico). Los metabolitos que llegaron a los hepatocitos a través de la vena porta, pasan a la circulación enterohepática, permitiendo la recaptación y solubilidad o biodisponibilidad sérica. Al llegar al intestino a través de la secreción biliar. El proceso por el cual los metabolitos se reciclan en la luz intestinal o en la sangre periférica para llegar al hígado se conoce como metabolismo de fase III. En esta fase, el reflujo o reciclaje de polifenoles es facilitado por el ATP-Binding-Cassette (ABC, transportador de membrana) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 y 2 (MRP-1 y 2). Finalmente, la eliminación de estos compuestos que no sean recaptados es por vía biliar, urinaria o heces. De manera que es importante destacar que es la estructura química de los polifenoles y no su concentración lo que determina la velocidad, el grado de absorción y la naturaleza de los metabolitos que circulan en el plasma. Los polifenoles más comunes en nuestra dieta no son necesariamente los que muestran mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana; en consecuencia, las propiedades biológicas de los polifenoles difieren mucho de un polifenol a otro (Pandey y Rizvi, 2009; Kim *et al.*, 2016; Orozco *et al.*, 2019). La acumulación de polifenoles en los tejidos es la fase más importante de su metabolismo porque esta es la concentración que es biológicamente activa para ejercer efectos en los tejidos diana (Pandey y Rizvi, 2009).

Se ha descrito que los polifenoles están presentes en el cerebro en bajas concentraciones (1 nmol/g de tejido), siendo suficientes para afectar las vías neuronales. Muestran la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por difusión ya sea como agliconas o como sus productos de conjugación, ya que el polifenol interactúa con las proteínas de membrana a través de interacciones de Van der Waals y la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos polares de cabeza de lípidos para los fenoles hidrofílicos, facilitando el transporte a través de la bicapa lipídica, la capacidad de los flavonoides de permear la BHE no sólo depende de su lipofilicidad sino también de su capacidad de conjugación; metabolitos que son conjugados por metilación en el intestino delgado y en el hígado, al ser más lipofílicos, pueden permear la BHE con mayor facilidad que sus agliconas de origen. Los polifenoles menos lipofílicos atraviesan la BHE cuando se unen a transportadores específicos dependientes de ATP. Los polifenoles pueden interactuar directamente con los neurotransmisores en cascadas de señalización de varias quinasas como MAPK, PI3K y PKB (Frade *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Orozco *et al.*, 2019; Di Meo *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022).

Las fuentes dietéticas de polifenoles contienen no solo un compuesto fenólico sino una mezcla de varios compuestos fenólicos en diferentes formas químicas. Se ha reportado que el consumo dietético de flavonoides en personas es de alrededor de 1-2 g por día, esto no es una cifra definitiva ya que puede variar de acuerdo a la dieta de cada persona y también es difícil de calcular, ya que aún no hay información de la cantidad de polifenoles encontrada en muchos alimentos. La absorción y el metabolismo de los compuestos fenólicos de la dieta es un factor crucial para su biodisponibilidad, que a su vez es imprescindible para el establecimiento de una actividad biológica significativa (Szostak-Wegierek, 2014; Silveira *et al.*, 2019; Leclerc *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022). El metabolismo microbiano es un requisito previo para la absorción y también modula la actividad biológica de los compuestos. Los efectos sistémicos de los polifenoles de la dieta dependen en gran medida de la acción sinérgica que los polifenoles pueden ejercer después de entrar en circulación, y se ven afectados por otros componentes presentes en la dieta, la estructura química del propio polifenol, así como por factores endógenos como las actividades enzimáticas y factores sistémicos (edad, género y patologías) (Hanhineva *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2019). El almidón y la sacarosa son los carbohidratos dietéticos más importantes. Su digestión, absorción y metabolismo pueden estar influenciados por los polifenoles de la dieta y sus metabolitos. Estos compuestos pueden influir en el metabolismo de la glucosa por varios mecanismos, como la inhibición de la digestión de carbohidratos y la absorción de glucosa en el intestino, la estimulación de la secreción de insulina de las células β , la modulación de la liberación y producción de

glucosa del hígado y la activación de los receptores de insulina en tejidos sensibles a la insulina, además de brindar propiedades antiinflamatorias (Fig. 16) (Hanhineva *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016; Leclerc *et al.*, 2021; Alam *et al.*, 2022).

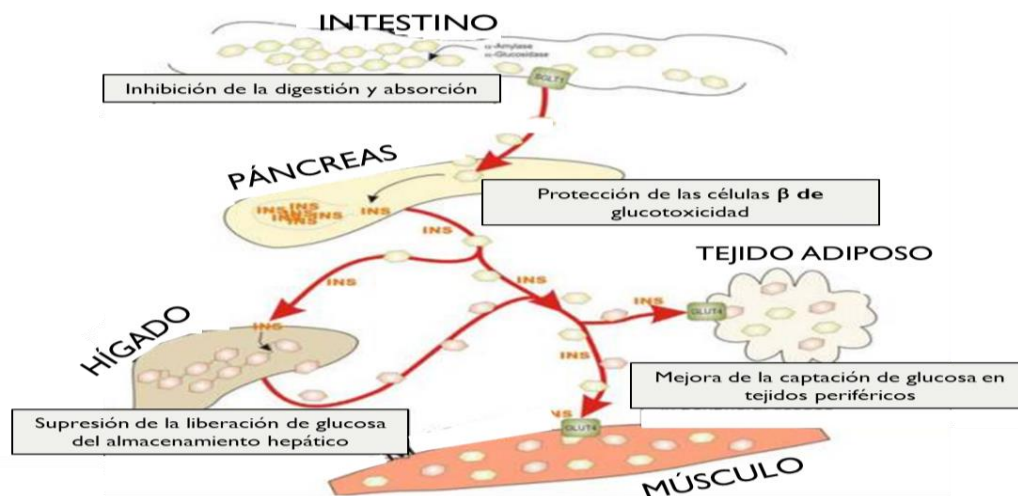


Figura 16. Sitios potenciales de acción de los polifenoles dietéticos sobre el metabolismo de los carbohidratos y la homeostasis de la glucosa. (Modificado de: Hanhineva *et al.*, 2010).

La digestión de carbohidratos y la absorción de glucosa son objetivos para mejorar el control de la glucemia después de comidas ricas en carbohidratos. La α -amilasa y la α -glucosidasa salivales, pancreáticas e intestinales son las enzimas clave responsables de la digestión de los carbohidratos a glucosa de la dieta, donde estas enzimas rompen los enlaces α -1,4 y α -1,6 de los polímeros de la glucosa (carbohidratos). Se ha demostrado que una variedad de polifenoles inhiben las actividades de α -amilasa y α -glucosidasa, y por lo tanto la digestión y absorción de carbohidratos de la dieta (Hanhineva *et al.*, 2010; Leclerc *et al.*, 2021).

II.1.8 Las plantas medicinales. Efectos neuroprotectores y antioxidantes

Dada la patogénesis multifactorial de la DM, es apropiado y prometedor utilizar medicamentos antidiabéticos naturalmente equilibrados en la terapia de esta enfermedad. Estos medicamentos deberían mostrar un impacto multidireccional complejo en varios aspectos de patogénesis de la enfermedad, por ejemplo, reducir la glucosa en sangre y la resistencia a la insulina. Las plantas medicinales debido a su rica composición química muestran una amplia gama de propiedades farmacológicas que pueden actuar individualmente o en sinergia para curar enfermedades y mejorar la salud. Las plantas siempre se consideran una de las fuentes más confiables de agentes curativos para enfermedades y muchos fármacos se derivan directa o indirectamente de ellas. Las fitomedicinas se combinan bien con los fármacos antidiabéticos, mejorando su resultado terapéutico y provocando menos efectos secundarios adversos

durante su uso prolongado (Wang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2023 a). Estudios científicos confirman la seguridad y eficacia de los fármacos de origen natural (Orozco *et al.*, 2019; Hachkova *et al.*, 2021; Alam *et al.*, 2022). El empleo de plantas medicinales está aumentando de forma exponencial tanto para mejorar el estado de salud general como para tratar enfermedades crónicas (Muñoz y Alfaya, 2015). La asociación de los extractos de plantas con la DM2 se ha demostrado a través de sus efectos terapéuticos, donde los extractos naturales tratan las complicaciones de la DM con una toxicidad mínima y menos reacciones adversas (Zhang *et al.*, 2020). La eficacia puede demostrarse mediante resultados de laboratorio y algunos mecanismos principales, que incluyen el transporte y el metabolismo de la glucosa, la actividad antiinflamatoria y antioxidante, el metabolismo de los lípidos, etc. Esto se ha demostrado en modelos experimentales tanto *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos (Lee *et al.*, 2021). Los fármacos antidiabéticos como las sulfonilureas y las biguanidas tienen efectos secundarios adversos. Se ha informado anteriormente que las plantas medicinales son beneficiosas para el control de la hiperglucemia en todo el mundo y se han utilizado en gran medida como remedios antidiabéticos (Patel *et al.*, 2012).

Las plantas medicinales se están volviendo populares como fuentes alternativas de regímenes terapéuticos, debido a que varios materiales naturales utilizados en la medicina popular son eficaces, presentan menos efectos secundarios clínicos y, a menudo, son fáciles de conseguir con un precio relativamente bajo (Chukwuma *et al.*, 2019; Alam *et al.*, 2022). Estudios han dado crédito a las propiedades farmacológicas de los compuestos de origen vegetal en el tratamiento de varias enfermedades, incluida la DM. Los compuestos bioactivos relacionados incluyen flavonoides, compuestos fenólicos, cumarinas, terpenos, terpenoides y macromoléculas como péptidos, aceites y carbohidratos (Al Disi *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2022), donde una revisión hecha en 2012 realizada por Patel *et al.*, y otra por Taika *et al.*, en 2018 reportaron que la actividad antidiabética se atribuye principalmente a la presencia de polifenoles, flavonoides, saponias, terpenoides y cumarinas. Los efectos antihiper glucémicos de las plantas que se dice que son antidiabéticas se han atribuido principalmente a su capacidad para restablecer los tejidos pancreáticos que funcionan aumentando la producción de insulina, como las sulfonilureas, en la inhibición de la absorción intestinal de glucosa como la acarbosa, un oligosacárido, aumentando el metabolismo de los medios insulino-dependientes y reduciendo los niveles de ROS. Entre estas plantas con actividad antihiper glucémica se pueden encontrar una gran diversidad de plantas, entre ellas, *Sphatodea campanulata* (Taika *et al.*, 2018; Chukwuma *et al.*, 2019).

Las plantas de la familia Bignoneaceae son conocidas por producir compuestos con propiedades aromáticas, medicinales y nutricionales. Cuando estos compuestos se aíslan, purifican e incorporan en complementos alimenticios o medicamentos, pueden evitar deficiencias metabólicas y prevenir muchos tipos de enfermedades. Además, sus hojas, flores y corteza de tallo se utilizan en la medicina popular para tratar edemas, diarreas, complicaciones estomacales, diuréticos y antiinflamatorios. Ha habido un interés creciente en los compuestos bioactivos producidos por las plantas, por sus efectos beneficiosos para la salud humana, como la actividad antioxidante. Los compuestos antioxidantes, cuando se aíslan e identifican, pueden usarse para el desarrollo y formulación de varios productos relacionados con la alimentación, la cosmetología y los productos farmacéuticos. Los antioxidantes son esenciales para prevenir el daño oxidativo en las células vivas y el deterioro oxidativo en los alimentos. Estos compuestos pueden retrasar las reacciones de degradación oxidativa al formar complejos con metales prooxidantes o reducir la oxidación de las estructuras celulares al inhibir la producción o eliminar los radicales libres (Santos *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022). Dentro de los compuestos antioxidantes como los compuestos fenólicos, particularmente aquellos cuyos grupos hidroxilo se encuentran en posición *orto* o *para*, tienen un papel en las reacciones redox, donde actúan como agentes reductores y donadores de hidrógeno. Por lo tanto, los polifenoles interfieren con la oxidación de las biomoléculas al donar rápidamente protones a los radicales o al reaccionar con los radicales para formar compuestos que les impiden reaccionar con otras moléculas. Además, los polifenoles pueden interactuar con receptores o enzimas involucradas en la traducción de señales, modificando así la oxidación celular y promoviendo una condición antioxidante. Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados. Además, algunos flavonoides pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando así la formación de las ROS producidas por la reacción de Fenton. Los polifenoles también pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular, como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa. Por lo que los polifenoles son conocidos como excelentes moléculas antioxidantes. De hecho, existe una correlación directa positiva entre la capacidad antioxidante de los polifenoles y el número de grupos hidroxilo presentes en la estructura fenólica. A pesar de que el efecto antioxidante se reduce solo a la eliminación y el bloqueo de los efectos de los radicales libres, las estrategias para la actividad antioxidante de los polifenoles van más allá de la neutralización de los radicales libres e incluyen otras actividades, como control enzimático, regulación de vías de señalización e intervención en el ciclo celular (Quiñones *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2022).

También los polifenoles han sido implicados como posibles agentes preventivos y curativos para una serie de enfermedades, como la EA, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de fatiga crónica, la hipercolesterolemia, la DM, accidente cerebrovascular, varios tipos de cáncer, enfermedad cardiovascular, autismo, vitíligo, entre otros, donde todas estas patologías tienen como factores comunes el estrés oxidativo y la inflamación, y dado que los humanos tienen mecanismos endógenos para mantener la homeostasis redox pero estos mecanismos fallan o se descompensan en contextos patológicos, es por eso que son tan importantes las fuentes exógenas de antioxidantes capaces de hacer frente al estrés oxidativo como los polifenoles (Pandey y Rizvi 2009; Leclerc *et al.*, 2021).

Además de los efectos antioxidantes brindados por los polifenoles también se ha descubierto que tienen un gran potencial terapéutico en la disfunción cognitiva inducida por la DM, en donde la regulación o estimulación en diferentes puntos de las vías de señalización de supervivencia neuronal puede ser un enfoque prometedor para el tratamiento de enfermedades del SNC, ya que muchas vías modulan la supervivencia celular en el SNC, así como enfermedades relacionadas (Zhang *et al.*, 2020). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un miembro de la familia de las neurotropinas, está asociado con el desarrollo y la regeneración (neurogénesis) de las neuronas. El receptor de proteína transmembrana tropomiosina quinasa B (TrkB) es un receptor específico para BDNF, que se expresa ampliamente en el cerebro de los mamíferos. Tanto BDNF como TrkB son esenciales para la plasticidad sináptica adulta y la formación de recuerdos. Tanto BDNF como los polifenoles al estimular a TrkB activa tres importantes cascadas de señalización intracelular aguas abajo, incluidas las vías PI3K/Akt, fosfolipasa C- γ (PLC- γ) y MAPK/ERK. Estas cascadas de señalización finalmente provocan la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB) y regulan la transcripción en las neuronas (Binder y Scharfman., 2004; Bathina y Das, 2015; Mohammadi *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2022). CREB es un factor de transcripción celular en eucariotas superiores y es bastante abundante en el cerebro, en particular en las neuronas. El número de neuronas supervivientes está estrechamente relacionado con el nivel de CREB fosforilado (pCREB), que desempeña un papel importante en el aprendizaje y la memoria en el cerebro (Zhang *et al.*, 2020). En el hipocampo, se ha demostrado que la activación de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y su efector posterior Akt podría regular al alza la fosforilación de CREB y prevenir así la muerte neuronal (Srivastava *et al.*, 2018). La señalización de BDNF/TrkB está involucrada en la supervivencia neuronal, la formación de memoria, efectos similares a los antidepresivos, plasticidad neural y resistencia al estrés. La vía ERK (cinasa regulada por señal extracelular), una parte de las MAPK, ha estado involucrada en varias funciones fisiológicas de las neuronas, incluida la proliferación, la diferenciación

y la supervivencia. ERK1/2 se activa después de la fosforilación de residuos de treonina y tirosina, y luego cambia su localización y fosforila diferentes moléculas diana. CREB es un regulador aguas abajo de la cascada ERK, que se ha propuesto que participa en la proliferación neuronal, la neuroplasticidad, la emoción y la cognición. Las proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKs) es una familia de proteína quinasas de serina/treonina (CaMKI, CaMKII y CaMKIV). CaMKII se expresa abundantemente en los sitios postsinápticos y su activación contribuye a la fosforilación de la proteína sináptica. CaMKIV se encuentra principalmente en los núcleos neuronales y es crucial para la memoria a largo plazo del cerebro al activar CREB, que a su vez, estimula la transcripción de genes diana uniéndose a las región del ADN de elementos de respuesta de AMP cíclico (CRE), además, la vía CREB tiene efectos positivos sobre la salud cognitiva, la supervivencia neuronal, la neurogénesis, la plasticidad sináptica y en general para la activación neuronal. Los polifenoles también pueden unirse al receptor de estrógeno (ER) y activar efectos neurotróficos a través de vías de la proteína quinasa C (PKC) (Fig. 17) (Bathina y Das, 2015; Zhang *et al.*, 2020; Di Meo *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022; Sasikumar *et al.*, 2022).

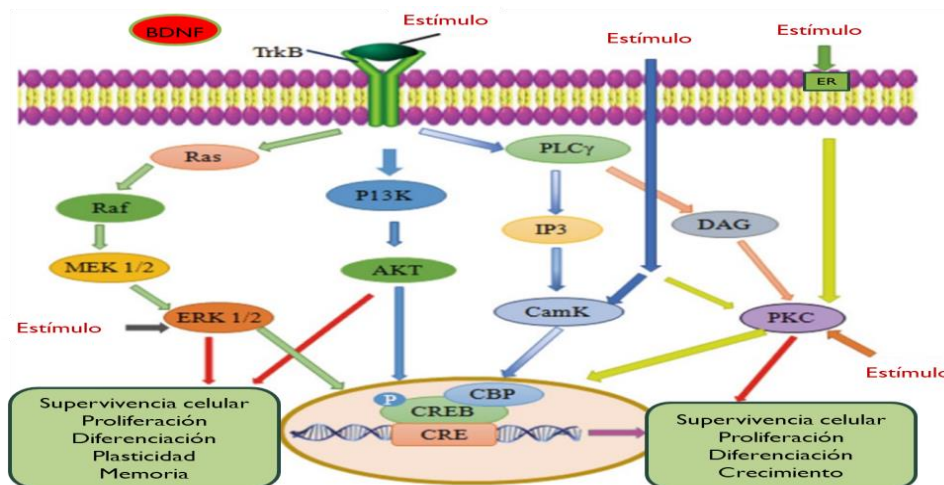


Figura 17. Principales vías de señalización del efecto neuroprotector de polifenoles. Los polifenoles se unen a los receptores TrkB estimulando la fosforilación de estos receptores. Los receptores activados pueden activar las vías MAPK, PI3K y fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ 1), que finalmente conducen a la fosforilación de la proteína CREB. CREB fosforilado y unido con la proteína de unión CBP estimula la transcripción de genes diana al unirse a CRE, transcribiendo diferentes procesos positivos para la cognición. Diacilglicerol (DAG), trifosfato de inositol (IP3), proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), MAP-cinasa-cinasa (MEK) (Modificado de: Zhang *et al.*, 2020).

Además del efecto neuroprotector de los polifenoles en el cerebro, también pueden exhibir propiedades anti-neuroinflamatorias al bloquear la liberación de citocinas (IL-1 β , TNF- α) y propiedades antioxidantes al inhibir la producción de NO y PGE2, disminuir la activación de la NADPH oxidasa, prevenir la formación de ROS en el cerebro y presentar efectos antiapoptosis, mejorando la neuropatía diabética

(Orozco *et al.* 2019). Estos efectos son gracias a que los polifenoles son capaces de atravesar BHE para llegar a las lesiones cerebrales. Los polifenoles actúan mediante la regulación de CREB/TrkB y la inhibición de la vía NF- κ B/TNF- α , así como otros mecanismos (Di Meo *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022).

Además de esta vía los polifenoles pueden generar neuroprotección a través de otras vías. Los polifenoles bioactivos pueden contrarrestar los efectos de la diabetes eliminando directamente las especies de radicales libres o bien activando proteínas cinasas que rompen el complejo Keap/Nrf2 permitiendo la translocación del factor transcripcional relacionado con el factor nuclear eritroide 2 al núcleo donde se une a los receptores ricos en adenilato y uridilato (ARE) y promueve la expresión de proteínas antioxidantes. Los polifenoles también pueden generar una acción anti-inflamatoria ya que regulan a la baja factores de transcripción pro-inflamatorios como NF-KB inhibiendo la síntesis de citosinas pro-inflamatorias. Como ya habíamos visto en la diapositiva pasada los polifenoles al incrementar la síntesis de factores neurotróficos como BDNF, el factor de crecimiento nervioso (NGF) o bien unirse directamente a los receptores de estos puede activar las vías de señalización cruciales para la neuroprotección, que van a prevenir la apoptosis al aumentar la expresión de BCL-2 y BCL-XL, entre otras moléculas antiapópticas, permitiendo la supervivencia celular. Además, los polifenoles al aumentar la fosforilación de PI3K-AKT reduce a las caspasas e inhibe las síntesis de moléculas proapoptóticas y por lo tanto la inhibición de apoptosis. Además, los polifenoles pueden causar la activación de MAPK induciendo la mitogénesis (Fig. 18) (Di Meo *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2022).

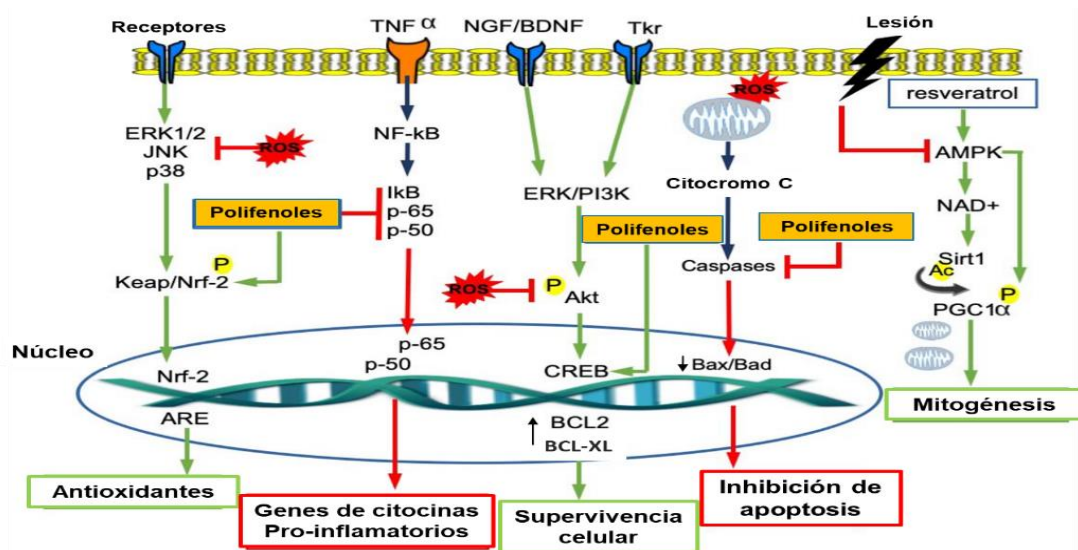


Figura 18. Otros efectos neuroprotectores brindados por polifenoles. (Modificado de: Di Meo *et al.*, 2020).

II.1.8.1 Metabolitos secundarios y mecanismos de acción

Se ha descubierto que las plantas con presencia de polifenoles, flavonoides, alcaloides y saponinas brindan propiedades antidiabéticas que apoyan y justifican su uso como tratamiento natural de la DM (Taika *et al.*, 2018). Una línea creciente de evidencia confirmó que los polifnoles tienen efectos beneficiosos sobre la DM al mejorar el control glucémico, el perfil lipídico, el estado antioxidante y recientemente también por brindar un efecto neuroprotector. Se ha informado de una amplia gama de efectos biológicos que incluyen actividades antiinflamatorias, antioxidantes, neuroprotectoras, nefroprotectoras y hepatoprotectoras de estos polifenoles, a parte de las ya descritas. Como ya hemos visto la hiperglucemia crónica y la dislipidemia están asociadas con varios cambios en las vías metabólicas intracelulares que conducen al daño tisular y al desarrollo de complicaciones diabéticas. Los cambios intracelulares incluyen la generación excesiva de ROS/nitrógeno intracelulares (RNS), aumento de precursores AGE's, acumulación de sorbitol, aumento del nivel de diacilglicerol, disminución de gliceraldehído-3 fosfato actividad deshidrogenasa (GAPDH) y aumento de la actividad de la vía de la hexosamina (Ghorbani, 2017). La figura 19 se muestran algunos de los efectos protectores de los polifenoles contra los cambios inducidos por hiperglucemia y dislipidemia en las vías metabólicas intracelulares.

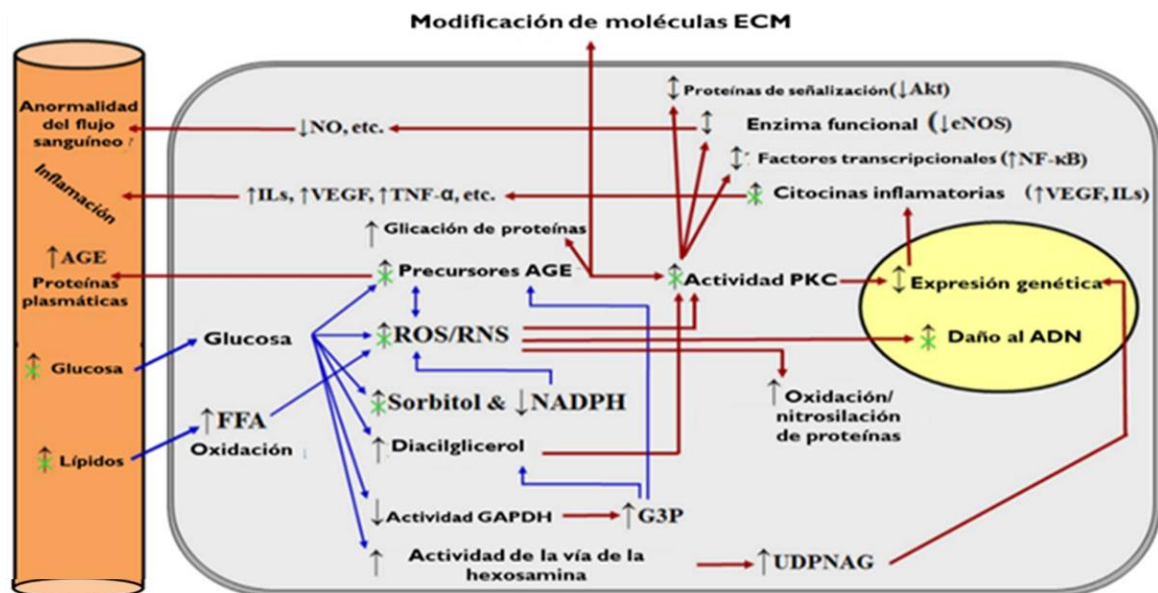


Figura 19. Descripción esquemática de los mecanismos protectores de polifenoles contra las vías intracelulares responsables de las complicaciones diabéticas. AGE: producto final de glicación avanzada; eNOS óxido nítrico sintasa endotelial; FFA: ácido graso libre; GAPDH; gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa; G3P: gliceraldehído-3-fosfato; IL: interleucinas; NO: óxido nítrico; PKC: proteína quinasa C; ROS / RNS: especies reactivas de oxígeno / nitrógeno; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; UDPNAG: difosfato de uridina N-acetilglucosamina; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; \uparrow : aumento; \downarrow : disminución; \updownarrow : efecto modulador; ☒ : efecto inhibidor de la rutina (flavonoide) (Modificado de: Ghorbani, 2017).

La generación excesiva de precursores de AGE da como resultado la glicación de proteínas intracelulares (p. ej., Proteínas implicadas en el control de la transcripción génica) y la modificación de las moléculas de la matriz extracelular (ECM). Los precursores de AGE también pueden difundirse fuera de las células y modificar las proteínas plasmáticas. Estas proteínas plasmáticas AGE pueden unirse a los receptores AGE y, por tanto, desencadenar la formación de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias, que a su vez contribuyen a la patología vascular (Vetter, 2015). En condiciones *in vitro*, se ha demostrado que los flavonoides suprimen la formación de AGE en proteínas musculares y renales de rata, así como en proteínas del cristalino (Muthenna *et al.*, 2012). Además, el tratamiento de ratas diabéticas con flavonoides reduce el contenido de colágeno y aumenta la actividad de las metaloproteinasas de la matriz en el riñón, por lo que gracias a su eliminación no sufren de glicación enzimática y por lo tanto no hay endurecimiento de los vasos sanguíneos (Ghorbani, 2017).

La hiperglucemia y la hiperlipidemia provocan la oxidación de la glucosa intracelular y los ácidos grasos libres, que generan un exceso de ROS/RNS. Además, un aumento de la concentración de glucosa intracelular da como resultado una mayor conversión de glucosa en sorbitol (por la aldosa reductasa), con el consumo concomitante de NADPH. La disminución de NADPH atenúa la regeneración del glutatión reducido, un antioxidante intracelular crítico y, por lo tanto, aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo. El aumento de la producción de ROS/RNS altera las funciones de biomoléculas intracelulares como proteínas, ARN y ADN. Además, la acumulación de ROS y el aumento de diacilglicerol inducido por la hiperglucemia activan la PKC, que a su vez promueve una variedad de procesos metabólicos en el citosol y el nucléolo según el tipo de célula. Por ejemplo, en las células vasculares, la activación crónica de la PKC se asocia con la permeabilidad vascular, la expansión de la ECM, la producción de factores inflamatorios, la adhesión de leucocitos, los cambios en la vasodilatación y la angiogénesis. Se ha demostrado que los flavonoides inhiben la aldosa reductasa y disminuye la concentración de sorbitol en los eritrocitos en condiciones de glucosa alta, lo que indica el potencial de los flavonoides para preservar el nivel intracelular de NADPH. En animales diabéticos, la administración de flavonoides mejoró el estado antioxidante en diferentes tejidos al aumentar los antioxidantes no enzimáticos (p. Ej., Glutatión reducido) y enzimáticos (p. Ej., Superóxido dismutasa y catalasa). El análisis de la relación estructura-función demuestra la importancia de los restos 3'-OH y 4'-OH en el efecto de eliminación de radicales libres de los flavonoides. Debido a estos OH, los flavonoides tienden a ceder electrones a los radicales libres, convirtiéndolos en radicales intermedios más estables e inhibiendo más reacciones de radicales libres (Ghiasi y Heravi, 2011; Ghorbani, 2017; Yan *et al.*, 2022). La actividad antioxidante de los

flavonoides y su efecto inhibitor sobre la formación de AGE crean la expectativa de que pueden interferir con las vías de señalización de PKC. Dada la activación de isoformas de PKC por la hiperglucemia y la hiperlipidemia que provoca un aumento del nivel de citocinas inflamatorias, se ha demostrado que el tratamiento de ratas diabéticas con flavonoides disminuyó el nivel de factores inflamatorios (p. Ej., TNF- α e IL-6) en el suero y en algunos tejidos, incluido el corazón (Das *et al.*, 2016). La neuropatía en los pacientes con DM se asocia con una percepción sensorial alterada, disfunción de las neuronas motoras y anomalías en la función autonómica. El tratamiento con flavonoides mejoró la actividad de Na⁺, K⁺ - ATPasa y redujo la expresión de la proteína proapoptótica caspasa-3 en los nervios ciáticos. Además, los flavonoides fueron capaces de reducir los marcadores proinflamatorios TNF- α , IL-1 β e IL6 en el suero de ratas diabéticas, así como atenuar la neuroinflamación (reduciendo NF- κ B, IL-6 y TNF- α) y el estrés oxidativo (reduciendo la generación de ROS y la peroxidación lipídica) en los nervios periféricos, lo que podría contribuir a sus efectos favorables sobre la neuropatía (Ghorbani, 2017).

Existen reportes de muchas otras plantas cuyos compuestos pueden inhibir vías y moléculas que intervienen en el desarrollo de la DM, por lo tanto, podrían ser utilizadas como tratamiento o tratamiento complementario de esta enfermedad por todas las actividades anteriormente descritas (Lee *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022).

II.1.9 Galeana (*Spathodea campanulata*). Descripción, clasificación taxonómica, componentes y usos en la medicina tradicional.

La especie *Spathodea campanulata* (*S. campanulata*) perteneciente a la familia Bignoniaceae es originaria de África desde donde fue introducida a Brasil, América y Asia como ornamental. *Spathodea* es un género monotípico de fanerógamas perteneciente a la familia de las bignoniáceas. La única especie de este género, *S. campanulata*, es conocida con diferentes nombres en todo latino américa y sudamérica como; tulipanero africano, árbol de la fontana, llama del bosque, llama Nandi, amapola y meaíto, caoba de Santo Domingo y gallito en Venezuela. En México se le conoce como Galeana, o simplemente como (árbol) tulipán (Franco *et al.*, 2015; Świątek *et al.*, 2022). *S. campamulata* (Galeana) es un árbol de porte medio (15 a 25 m de altura) y el diámetro del tronco puede ser de hasta 60 cm que presenta flores carnosas de color rojo (Fig. 20) (Cintra *et al.*, 2005). Es un árbol grande de copa tipo globosa, que requiere de un clima tropical o subtropical con temperaturas entre los 27°C y 30°C, pero también se puede observar en climas con temperatura entre los 23°C y 34°C. Es posible encontrar la distribución de esta especie en un intervalo altitudinal entre los 0-2000 msnm. Puede crecer en suelos ácidos y calizos con un pH entre los 4.5 y 8.0, ricos en humedad y necesita mucho Sol para su

crecimiento. El sistema radicular es poco profundo y altamente destructivo de andenes, cimientos y alcantarillados, además, se rompe fácilmente con el viento, constituyendo un peligro en los lugares urbanizados (Franco *et al.*, 2015; Cuadro, 2018).



Figura 20. *Spathodea campanulata* (Galeana). *S. campanulata* es un árbol originario de África. En México a este árbol se le conoce Galeana (Cuadro, 2018).

Las hojas de Galeana son compuestas imparipinadas (no crecen en pares al final de la rama), de forma elíptica según la forma del limbo, con nerviaciones pinnatinervia, el borde es entero y su ápice acuminado. Presentan un tono verde brillante y se encuentran ubicadas de forma opuesta en el tallo, la cantidad de hojas es relativamente grande con 4 o 9 pares de foliolos (Fig. 21 A). Las flores son de corola campanulada y presentan un color llamativo rojo-anaranjado con bordes amarillos (Fig. 21 B), la floración puede durar de entre 5 a 6 meses y la fructificación ocurre del mes de febrero a mayo (Rodríguez y Córdoba, 2009; Cuadro, 2018).

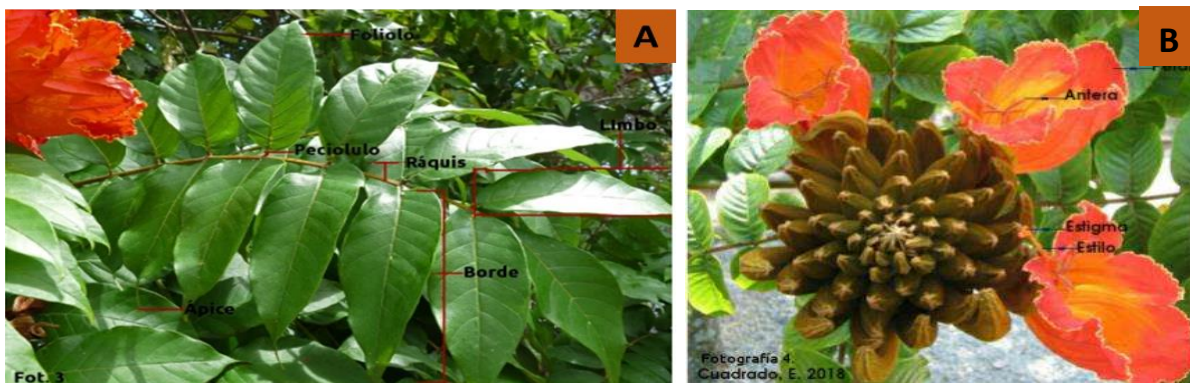


Figura 21. Hojas y Flores de *S. campanulata*. A) En la imagen se muestran las hojas de *S. campanulata*, en donde se observan las partes: pecíolo; que une la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo, ápice; que es el extremo superior o punta de la hoja, folículo; lugar donde se almacenan las semillas nacientes, raquis; es el eje (columna vertebral) de una hoja compuesta, borde; también llamada contorno, constituye el extremo del limbo y limbo; lámina que forma parte de la anatomía de una hoja por el haz (cara superior de la hoja) y por el envés (parte inferior de la hoja). B) Flores de galena (Cuadro, 2018).

Además de su llamativa belleza y uso ornamental, esta especie ha merecido atención debido a sus otros efectos investigados en propiedades medicinales y la utilización de sus compuestos como controladores naturales de plagas, como antimicrobiano y brindar efectos pesticidas e insecticidas en ciertos cultivos (Franco *et al.*, 2015), así como también se ha comenzado a probar su actividad como repelente y fungistático (Alarcón, 2014). La medicina popular relata las propiedades diuréticas y antiinflamatorias de *S. campanulata* en sus flores y el empleo de sus hojas contra enfermedades renales, contra úlceras, inflamaciones de la uretra y como antídoto contra venenos. Preparaciones de la cáscara del tronco pueden utilizarse para el tratamiento de edemas, micosis, herpes, antihemorroides, dolores de estómago, dolor de muelas y diarrea. Las flores y los extractos de corteza de tallo de *S. campanulata* han mostrado actividad molusquicida (plaguicidas utilizado para controlar los moluscos). Además, se observaron actividades hipoglucémicas, anti-VIH, anticancerígenas antibacterianas y antipalúdicas de la corteza del tallo y hojas (Pianaro *et al.*, 2007; Ofori *et al.*, 2009; Tanayen *et al.*, 2014; Teinkela *et al.*, 2016; Bachhav *et al.*, 2018; Escamilla, 2019; Świątek *et al.*, 2022). Asimismo, las flores y corteza de *S. campanulata* han sido evaluadas contra trastornos mentales, malaria, enfermedades infecciosas y cicatrización de heridas (Niyonzima *et al.*, 1999; Tanayen *et al.*, 2014; Teinkela *et al.*, 2016; Świątek *et al.*, 2022).

Existen varios estudios fitoquímicos con diferentes partes de *S. campanulata*, incluyendo cortezas de tallos, hojas, flores y frutos, en donde se han aislado diferentes compuestos tales como; ácido espaólico, esteroides, saponinas, ácido ursólico, ácido tomentosólico, además de sustancias pécticas (polisacáridos complejos de naturaleza ácida) que se han aislado de la corteza del tallo. Dentro de las hojas se han encontrado compuestos como; ácido ursólico, saponinas, ácido tomentosólico, ácido espaólico, sustancias pécticas, espatodol, ácido cafeico, otros ácidos fenólicos, flavonoides y carotenoides (Ngouela *et al.*, 1988; Ngouela *et al.*, 1991; Amusan *et al.*, 1995; Amusan *et al.*, 1996; Niyonzima *et al.*, 1999; EL-HELA, 2001; Flach, 2005; Pianaro *et al.*, 2007; Kumaresan *et al.*, 2011; Alarcón, 2014; Teinkela *et al.*, 2016; Kihdze *et al.*, 2016; Bachhav *et al.*, 2018). Estudios previos han demostrado la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides como principales fitoquímicos en las partes aéreas de *S. campanulata* (Santos *et al.*, 2020; Świątek *et al.*, 2022), con un porcentaje de 1373.23 mg de fenoles, 24.65 mg de polifenoles y 190.41 de flavonoides (Escamilla, 2019).

III. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica de causas múltiples que a partir de la hiperglucemia puede ocasionar complicaciones de salud graves provocando neuropatías, retinopatía, nefropatía y prácticamente daños al organismo completo, con un pronóstico letal si no se controla. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con DM se reduce entre 5 y 10 años. En 2022 esta enfermedad causó la defunción de 1.8 millones de personas. El desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico para su atención y la pérdida de calidad de vida para quienes padecen diabetes. En México, los costos de atención por paciente son de aproximadamente 1,415 dólares anuales, siendo una gran cantidad de dinero destinado a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones.

El vínculo entre la DM y la enfermedad degenerativa del cerebro está bien establecido, se ha relacionado el deterioro cognitivo en las personas con DM con la degeneración regional del cerebro, incluyendo patología neurodegenerativa grave. Dentro de los daños a tejidos que causa la DM está el hipocampo que debido a su complejidad estructural es vulnerable a los efectos de esta enfermedad, cualquier factor que altere el equilibrio entre la proliferación/muerte neuronal puede resultar en un deterioro de la memoria y el aprendizaje. Estudios han demostrado que la DM experimental causa una disminución de las células granulares, proliferación y muerte neuronal en las regiones CA y regiones del GD.

La administración de fármacos orales para el tratamiento de la DM puede tener efectos secundarios adversos como; hipoglucemia grave, aumento de peso, menor eficacia terapéutica debido a un régimen posológico inadecuado, baja potencia y efectos secundarios alterados debido al metabolismo del fármaco como especificidad del objetivo, solubilidad y permeabilidad. Provocando un bajo apego de los pacientes al tratamiento farmacológico por lo que se buscan alternativas de apoyo en el tratamiento de la DM.

La aceptación de las plantas como tratamiento de apoyo al tratamiento farmacológico en la DM se debe ha varias razones, entre las que se incluyen el diagnóstico erróneo y la incapacidad financiera por parte del sistema de salud. Las moléculas derivadas de plantas poseen compuestos terapéuticos potenciales capaces de mejorar y tratar varias enfermedades. *S. campanulata* ha merecido atención debido a sus propiedades medicinales y la utilización de sus compuestos con actividades hipoglucémicas, anti-VIH, anticancerígenas y antipalúdicas. Dado que los tratamientos farmacológicos tienen efectos secundarios adversos se buscan alternativas, una de ellas la ofrecen las plantas hipoglucemiantes y antioxidantes. Por lo que dentro de esta investigación se utilizaron los extractos acuosos de hojas de Galeana para evaluar su efecto neuroprotector sobre las neuronas del giro dentado en el hipocampo de ratas con DM2.

IV. HIPÓTESIS

La administración oral de extractos acuosos de hojas de Galeana (*Spathodea campanulata*) reducen significativamente el daño en neuronas del giro dentado del hipocampo de ratas con diabetes mellitus 2 comparadas con ratas diabéticas no tratadas y tratadas con metformina.

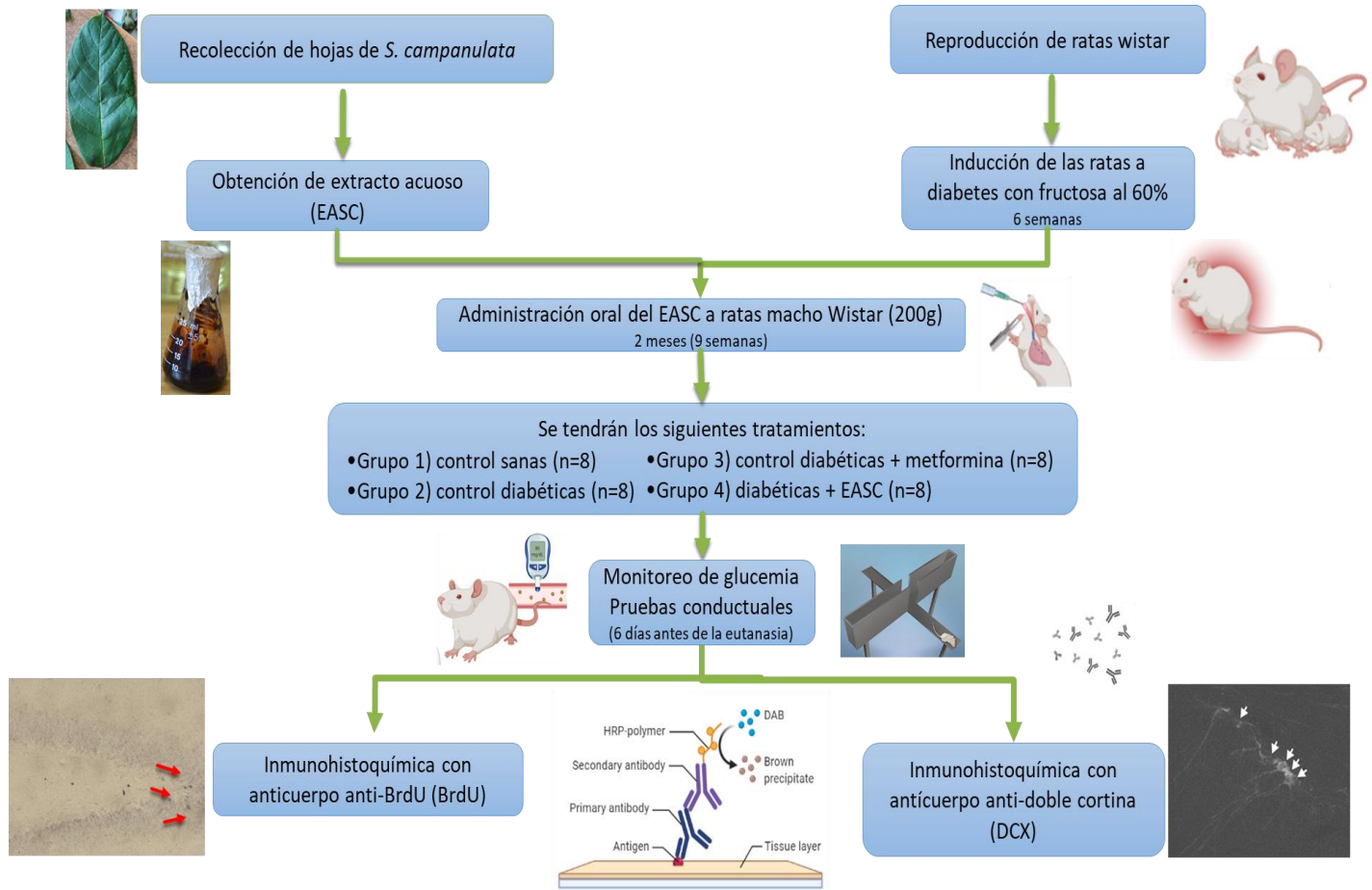
V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto neuroprotector en hipocampo tras la administración oral de extractos de *Spathodea campanulata* en ratas con diabetes mellitus tipo 2.

V.1 Objetivos particulares

1. Evaluar la memoria, aprendizaje y conducta ansiosa en las ratas diabéticas administradas con el extracto de hojas de Galeana.
2. Determinar la inhibición de las reducciones cerebrales de ratas con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tratadas con el extracto de Galeana
3. Evaluar el grado de daño en neuronas del giro dentado (GD) en hipocampo de ratas con DM2.
4. Cuantificar el efecto del extracto acuoso de hojas de Galeana sobre el daño celular en neuronas GD de hipocampo de ratas con DM2.
5. Valorar la tasa de neurogénesis del Giro dentado (GD) del hipocampo en ratas con DM2.
6. Establecer el efecto del extracto acuoso de hojas de Galeana sobre la tasa de neurogénesis en el GD en ratas con DM2.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Material

- **Animales:**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200-250 g. 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 de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NIH, 2001). Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética e Investigación FCMB-UMSNH. CEI/2023/I-302

- **Reactivos de grado analítico**

- **Extractos acuosos de hojas de Galeana**

VII.2 Métodos

- **Colecta de hojas:**

La colecta de hojas del árbol de Galeana se realizó en la Calzada Ventura Puente #27 Col. Cuauhtémoc en Morelia, Michoacán. Árbol que cuenta con identificación, clasificación y folio por parte del departamento de botánica del herbario nacional de México perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México. La cual fue clasificada como “Galeana”, familia Bignoniaceae, especie *Spathodea campanulata* P. Beauv., con el número de folio MEXU 1489469 (anexo 1).

- **Obtención del extracto acuoso:**

Las hojas de Galeana se sanitizaron y se deshidrataron en una incubadora. Se pesaron 300 mg de hojas que se homogeneizaron en agua destilada, se filtraron y centrifugaron (3000 rpm X 30 min) (Zeigen). El sobrenadante obtenido se le nombró como extracto acuoso de *Spathodea campanulata* (EASC).

- **Sanitización:**

Las hojas de *S. campanulata* se lavaron con jabón y cloro (cloro al 5%, Dodecil Sulfato de Sodio al 1%) (5 ml/100 ml de agua), a continuación, se enjuagaron en agua de la llave y posteriormente se volvieron a enjuagar con agua destilada estéril.

- **Filtración:**

La filtración se realizó por gravedad vertiendo una mezcla sólido-líquido de las hojas de Galeana a través de un embudo que contenía un papel filtro con diámetro de poro de 6 μm , permitiendo que el líquido se filtrará mientras se atrapaba el sólido en el papel.

- **Modelo animal:**

Se usaron 32 ratas macho de la cepa Wistar con un peso a partir de 100 g. Ya que en este peso se consideran ratas que han alcanzado la pubertad. Al destete (día 21 después de nacer) comenzó la administración de fructosa de 6 semanas. Posteriormente ya con ratas diabéticas (>100 mg/dL), se les realizó durante 2 meses (9 semanas) la administración crónica del EASC, 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 a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 2011 del Consejo Nacional de Investigación. Donde siempre se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

Las ratas se distribuyeron en grupos de 8 ratas, de la siguiente manera:

- Grupo 1) control sanas
- Grupo 2) control diabéticas (DM2)
- Grupo 3) control diabéticas + metformina (100 mg/kg) (DM+MF)
- Grupo 4) diabéticas + EASC (300 mg/kg) (DM+EASC)

- **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 al destete y los animales se consideraron diabéticos, si su concentración de glucosa sanguínea se encontraba por arriba de 100 mg/dL a las 4-6 semanas posteriores a la administración de fructosa, y que presentaran un peso corporal superior a los 100g (Dupas *et al.*, 2016). La rata administrada 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).

- **Administración oral crónica de EASC y metformina:**

Los extractos fueron administrados por vía oral con una cánula de alimentación animal de 16 G x 3 y curvada de 3mm (NOM-062-ZOO-1999). La dosis administrada fue de 300 mg por kilogramo de peso

del animal durante 2 meses para que fuera considerada una administración de tipo crónico como determina la guía de la OECD, el EASC fue administrado cada 24 horas. Las ratas tratadas con metformina (MF) fueron administradas con una dosis de 100 mg/kg disuelta en agua estéril (Cheng *et al.*, 2006). Las ratas control sanas y control diabéticas fueron administradas con agua estéril de manera crónica para asemejar este estrés en las ratas.

- **Peso de los animales, glucosa sanguínea, hemoglobina glicosilada y prueba de orina:**

Durante la administración crónica se monitoreó una vez por semana el peso de los animales (balanza digital SF-400), para conocer la cantidad de EASC a administrar y observar si la cronicidad de la administración alteraba la salud del animal en relación con el apetito y al peso, así como también fueron medidas las concentraciones de glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Check Performa, Roche) para llevar un récord de este parámetro y evaluar el efecto hipoglucemiante a largo plazo del EASC. También se realizaron pruebas del porcentaje de hemoglobina glicosilada a la semana 0 (después de seis semanas de administración de fructosa) y en la semana 9 en cada rata para determinar el cambio de este parámetro, esta prueba se realizó mediante el kit Bio-Glico (MexLab). Además, se realizaron pruebas de orina general (EGO) de 10 parámetros con tiras reactivas (Combur 10 Test de Roche), estas se realizaron con la manipulación del animal que defeca y orina como respuesta al estrés.

- **Pruebas de conducta:**

La prueba de laberinto en cruz elevado (EPMT) es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento similar a la ansiedad. La prueba se basa en la aversión natural de las ratas a las áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio natural y espontáneo en entornos novedosos. El aparato consta de brazos abiertos (con luz) y brazos cerrados (luz baja), cruzados en el medio perpendicularmente entre sí, y un área central. A las ratas se les dio acceso a todos los brazos y se les permitió moverse libremente entre ellos. El número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo pasado en los brazos abiertos se utilizaron como índices de ansiedad inducida por el espacio abierto en las ratas (Komada *et al.*, 2008). Teóricamente las ratas sanas comparadas con ratas enfermas (diabéticas o con deterioro cognitivo) son menos ansiosas y con mayor interés por entornos novedosos. Esta prueba se realizó con ratas aclimatadas (sin estrés), las ratas fueron colocadas durante 5 minutos sobre el laberinto de cruz sobre el eje central con orientación hacia uno de los brazos cerrados, donde se evaluó las entradas a los brazos abiertos, así como el tiempo que se mantienen tanto en los brazos abiertos como en los cerrados, con el programa Plusmaze. Para evaluar la conducta tipo ansiosa, se utilizaron como parámetros el porcentaje de tiempo y entradas a los brazos abiertos. Después de probar cada rata, se

limpió la cabeza cruzada y se eliminó cualquier olor con alcohol al 70% y después agua, dejando secar para continuar con el siguiente animal. Las sesiones fueron grabadas con una cámara de vídeo sobre el laberinto.

La prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NORT) se llevó a cabo en una caja de madera cuadrada con viruta, con paredes altas que carece de señales espaciales polarizadas sin objetos, en la que un día previo a la prueba las ratas se introdujeron para que exploren y se familiaricen con la caja (evitando algún tipo de estrés o variación el día de la prueba) durante 10 minutos. Al día siguiente durante lo que se conoce como sesión de entrenamiento o muestra, la rata exploró dos objetos idénticos dentro de la caja (conocido como escenario familiar) durante 10 minutos. Una vez completada la sesión de muestra, el animal se retiró de la caja durante una hora (es decir, un retraso de retención), durante el cual se consolida la memoria del objeto. Para la siguiente sesión de prueba, se ingresó a la rata a la misma caja, que ahora contenía un objeto de los de la sesión de muestra y un objeto nuevo novedoso, como prueba de recuperación de la memoria a corto plazo del objeto. Las ratas deben mostrar un interés mayor por el objeto nuevo que por el que ya conocen, este parámetro se evaluó durante 5 minutos. Las ratas deben explorar los objetos utilizando múltiples sentidos (principalmente olfato y tacto), por lo que se tomó como tiempo de exploración únicamente cuando la rata olfatió a menos de 2 cm los objetos. En cada fase de la prueba los objetos fueron sanitizados con etanol al 70% y agua para evitar que tuvieran olores residuales. El comportamiento de exploración de objetos es fácilmente cuantificable y permite el estudio de recuerdos de tipo episódico en roedores. Los roedores exhiben una propensión natural a explorar objetos novedosos y no amenazantes y, por lo tanto, es por eso que durante la sesión de prueba, los roedores muestran una preferencia por explorar el objeto nuevo más que el familiar, se considera que una preferencia baja por objetos nuevos durante la sesión de prueba es indicativo de una memoria de objetos deteriorada y por lo tanto un hipocampo lesionado. NORT es un método para probar la neurobiología de la memoria (corto plazo) y aprendizaje no espacial en roedores. La ventaja de esta prueba es que no requiere ninguna motivación externa, entrenamiento, recompensa o castigo, por lo que no genera ningún estrés (Cohen y Stackman, 2015) y por lo tanto no interfiere con el análisis posterior de neurogénesis. Se registró el tiempo dedicado a explorar cada objeto y el tiempo total de exploración durante la sesión de prueba. El índice de discriminación (DI) de objetos nuevos se calcula como el tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo dividido por el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos.

La prueba de reconocimiento espacial (SRT) sirve para evaluar la disfunción en la memoria topográfica y su aprendizaje espacial. Se ha demostrado que este tipo de memoria está mediada por el hipocampo en

humanos (Havolli *et al.*, 2017). La prueba consistió en introducir a la rata en una caja como la descrita anteriormente con dos objetos idénticos los cuales la rata exploró por igual, además se colocaron fuera de la caja dos objetos visibles para que la rata pudiera observar y de esta manera ubicar los objetos dentro de la caja con respecto a los objetos fuera de la caja. Se dejó que la rata explorará bajo estas condiciones 10 minutos los objetos y después fue retirada de la caja. A continuación, se realizó el cambio de lugar de uno de los objetos dentro de la caja. Una hora después se introdujo la rata a la caja, y se evaluó la exploración de la rata a ambos objetos durante 5 minutos. Las ratas sin daño en su memoria topográfica y aprendizaje espacial deberán notar el cambio del objeto con respecto a los objetos fuera de la caja, por lo que deberían pasar mayor tiempo explorando el objeto que cambio de lugar, este parámetro es conocido como índice de discriminación (DI) (Havolli *et al.*, 2017).

- **Perfusión cardíaca:**

Para el análisis morfológico celular se utilizó una “n” biológica de 8 individuos por grupo. Posterior a la administración crónica de EASC y metformina, así como de solución salina en los grupos control, las ratas se eutanizaron con una dosis letal de pentobarbital sódico de 150 ml/kg (como se describe en la NOM 062-ZOO-1999, con una dosis de entre 120 a 210 ml/kg). Posteriormente se perfundieron por vía intracardiaca, a través del ventrículo izquierdo, con solución salina al 0.9 %, y paraformaldehído (PFA) al 4% en PB (Buffer de fosfatos 0.1M). Se realizó la extracción de los cerebros y se fijaron durante 24 horas con PFA, posteriormente se colocaron en soluciones de sacarosa al 20% y 24 horas después en sacarosa al 30% hasta su posterior procesamiento.

Los cerebros permanecieron en sacarosa al 30% en PB a 4 °C hasta su procesamiento, posteriormente se realizaron cortes coronales de 40 µm, en el criostato a -22°C. Se realizaron una serie de cortes coronales de 40 µm de espesor, del hipocampo dorsal localizado entre -1.22 mm y -4.56 mm a partir de bregma, de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas (Paxinos y Watson, 2009). Los cortes coronales se sometieron a inmunohistoquímica, dichos cortes fueron observados en el microscopio óptico (Axioskop 40 Carl Zeiss) a 500x, 1000x, y se realizó el conteo de neuronas y precursores neuronales en una extensión lineal de 600 µm del estrato piramidal del GD en el hipocampo.

- **Medición y pesado de cerebros:**

Una vez obtenidos los cerebros antes de ser fijados en PFA, se realizó un corte a la altura del cerebelo para evitar variaciones entre los pesos, se tomaron medidas con un calibrador Vernier de lo largo y ancho del cerebro completo. A continuación, se pesaron los cerebros en una balanza granataria (Kern ABJ 80-4M). Estos parámetros nos indican si existe o no una reducción de tamaño en el cerebro causada por la

DM (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2014). Para calcular este parámetro se utilizó el cociente del peso en miligramos del cerebro entre el peso corporal de la rata en gramos.

- **Inmunohistoquímica:**

Los cerebros se congelaron en metil butano a -30 °C (5 min.) y posteriormente se procesaron para obtener cortes coronales seriados de 40 µm de grosor, con una distancia de 240 µm cada uno; los cortes se realizaron en un crióstato (Triangle biomedical sciences, TBS) a -22 °C. Los cortes fueron inmunoteñidos con anticuerpos específicos anti-bromodesoxiuridina (BrdU) y anti-DCX para identificar precursores neurales y neuronas en el Giro Dentado (GD) del hipocampo.

Para la inmunotinción con BrdU, las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con BrdU (023K1260 de SIGMA) disuelto en solución salina 3 días antes de cumplir los 2 meses de administración crónica (esto para observar precursores neurales) con 50 mg/kg durante 3 días por la mañana y la tarde con 8 hrs de diferencia (Lang *et al.*, 2009). Una vez obtenidos los cortes se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol para hacer el bloqueo de endo peroxidases, se realizaron 3 lavados en PB. Se incubaron 2 horas en formamida (Baker) al 50% en buffer de cloruro de sodio-citrato de sodio 20x (SSC 20x) para la desnaturalización de ácidos nucleicos, se llevó a pH de 7 y filtró. A continuación, se hizo un lavado en SSC 20x, y se dejó incubar en HCL 1N a 37 °C durante 30 min, se incubó en buffer de boratos 0.1M en pH de 8.5 y realizaron lavados con PB para después incubar en solución bloqueadora durante 30 min; se incubaron por 48 horas en el anticuerpo primario anti-BrdU policlonal de conejo (ROCHE) en una disolución 1:3,000 a 4 °C. Se realizaron lavados y se incubaron en el anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-rabbit IgG 1:750, Vector laboratories) por un lapso de 2 horas, posteriormente se sometió a una incubación con el complejo Avidina-biotina. Para el revelado se utilizó el kit de DAB durante 10 min. Se detuvo la reacción con PB y los cortes fueron montados en laminillas gelatinizadas (grenetina 1%) dejándose secar a temperatura ambiente. Finalmente, se les colocó un medio de montaje (cytoseal 60) al que se le colocó un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para la inmunotinción con DCX los cortes se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno en metanol seguido de una solución de peróxido de hidrógeno al 10%, en PB (buffer de fosfatos, pH 7.4) con tritón X-100 (PBT 0.1M, tritón X-100 5%) para bloquear las peroxidases endógenas. Se realizaron 3 lavados con PB, se incubaron en una solución bloqueadora (Suero de caballo 5%, PBT 0.1M) por un lapso de 30 minutos; se incubaron por 24 horas en el anticuerpo primario anti-DCX monoclonal de ratón (AB104224 de ABCAM) en una disolución 1:7,000 a 4°C. Se realizaron lavados y se incubaron en el

anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-mouse IgG 1:750, Vector laboratories) por un lapso de 2 horas más, posteriormente se sometió a una incubación con el complejo Avidina-biotina (Elite ABC kit, vector laboratories) durante 90 min. Para el revelado se utilizó un kit de diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories) durante 5 min. Se detuvo la reacción con PB y los cortes fueron montados en laminillas gelatinizadas (gretina 1%) dejándose secar a temperatura ambiente. Finalmente, fueron montados como se describió anteriormente.

- **Análisis de precursores neurales y neuronas en el GD:**

Se realizó un muestreo sistemático semiestereológico aleatorio a lo largo del plano rostro-caudal del cerebro. Para llevarlo a cabo, se seleccionó uno de cada seis cortes de 40 μm de grosor con 240 μm de distancia entre cada uno. Para los conteos se consideraron las células positivas para BrdU y DCX en las capas granular y subgranular del GD del hipocampo abarcando la porción dorsal (-1.58mm hasta -2.70mm) de Bregma. Se analizaron 2 campos por corte de manera bilateral, con un total de 6 cortes. Se tomaron registros fotográficos de los cortes con un microscopio de campo claro con un objetivo de 500x y 1000x acoplado a una cámara de video digital (AxioCam MRC Carl Zeiss). La evaluación del área (μm^2) de cada campo analizado se realizó por medio del programa analizador de imágenes Axiovisión Rel 4.0 (Carl Zeiss). El área se delimitó a la zona de la capa granular y subgranular determinándose el área en 150,000 μm^2 (\pm 10,000 μm^2) con el analizador de imágenes y se contaron las células dentro de la misma. Se realizó el registro en células totales por mm^2 .

VII.3 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados por medio de estadística descriptiva donde se utilizaron las medidas de tendencia central y dispersión de valores (media \pm error estándar). Asimismo, en caso de ser normal la distribución de datos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y se realizó una prueba de Tukey *post hoc*, con ayuda del programa estadístico Prisma 6.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Efecto hipoglucemiante de *S. campanulata*

La concentración de glucosa en sangre de los animales fue monitoreada semanalmente. Donde se observó un efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *S. campanulata* (EASC). En la figura 22 se muestran las concentraciones de glucosa sanguínea obtenidas desde dos semanas antes (-2) de empezar con la administración de los tratamientos, donde se confirmó el establecimiento de DM2 en los animales de experimentación, ya que en la semana cero se observa una glucemia por arriba de 130 mg/dL en las ratas a las que se les expuso a fructosa. Se puede observar en la gráfica que la glucemia se redujo desde la primera semana y deja de presentar una diferencia significativa ($P= 0.4981$) a partir de la tercera semana en el grupo de ratas diabéticas administradas con el EASC (DM+EASC) en comparación con el grupo control, donde la glucemia continuó reduciéndose hasta alcanzar un control constante de la glucosa por debajo de 100 mg/dL, llegando incluso a niveles por debajo de 90 mg/dL de glucosa en las últimas dos semanas, teniendo así un mejor control de glucosa comparado con las ratas diabéticas tratadas con metformina (DM+MF) y las ratas diabéticas control (DM2). En el caso de las ratas diabéticas tratadas con MF se observó una reducción de la glucemia desde la primer semana, sin embargo, dejó de presentar una diferencia significativa ($P= 0.6234$) hasta la séptima semana respecto al grupo control y en el caso de las ratas diabéticas sin tratamiento la glucemia permaneció elevada. Al comparar todos los grupos a partir de la semana cero hasta la semana nueve se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre todos ellos, donde mostró una mayor y más rápida reducción de glucemia el tratamiento con el EASC en comparación con la MF, sin embargo, ambos tratamientos redujeron la glucemia en comparación con el grupo diabético sin tratamiento.

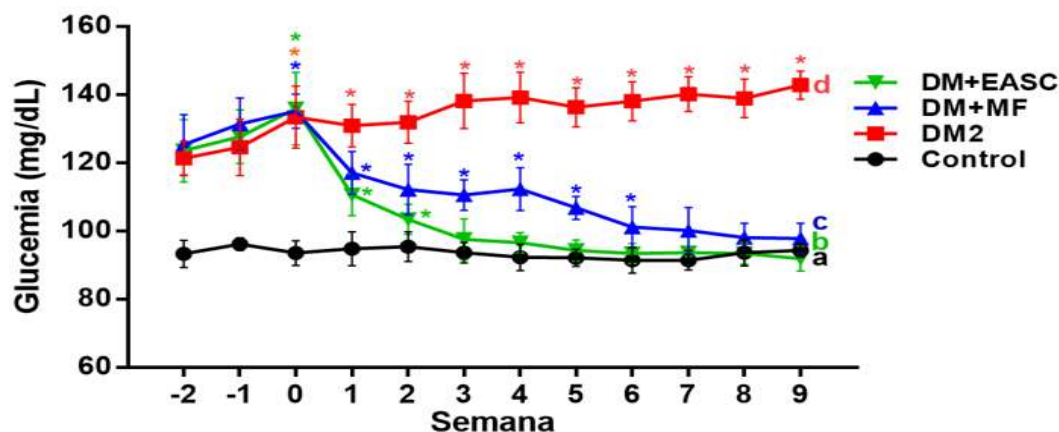


Figura 22. Glucosa sanguínea en ratas diabéticas administradas con los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm EE ($n=8$). Los asteriscos (*) representan las diferencias significativas de cada grupo en cada semana respecto al grupo control y las letras indican diferencias significativas entre los grupos obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P\leq 0.05$).

También se calculó el porcentaje de reducción en la concentración de glucosa inicial (semana 0) respecto a la final (semana 9) de cada tratamiento, donde en el caso de las ratas diabéticas sin tratamiento no existió tal reducción. En el caso de las ratas tratadas con MF se observó una reducción del 27.66%, siendo esta menor en comparación con las ratas tratadas con el extracto con un 32.39%. Además, al calcular el porcentaje de reducción de la glucosa en relación con la MF, se puede observar que el tratamiento con el extracto resultó en un porcentaje mayor de reducción de la glucosa. De igual forma se realizó el cálculo del área bajo la curva de los diferentes tratamientos, obteniendo un área bajo la curva inferior en el tratamiento con el EASC respecto al tratamiento con MF. Con todos estos resultados se permite visualizar y confirmar una vez más, que el efecto hipoglucémico es mejor con el tratamiento del EASC respecto al de MF en ratas con DM2.

Tratamiento	Reducción (%) inicial y final glucosa	Reducción (%) en relación a metformina	Área bajo la curva (%)
DM2	0 ± 2.14 a	0 ± 2.14 a	100
DM+MF (100 mg/kg)	27.66 ± 3.31 b	100 ± 4.31 b	83.34
DM+EASC (300 mg/kg)	32.39 ± 4.41 c	118.05 ± 3.11 c	77.81
Control	0.95 ± 1.32 d	2.01 ± 1.37 d	69.31

Tabla 3. Reducción en la concentración de glucosa y porcentaje de área bajo la curva de las concentraciones de glucosa con los diferentes tratamientos. Los datos representan la media ± EE (n=8). Las letras representan las diferencias significativas entre los grupos obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa (P≤ 0.05).

A las mismas ratas se les realizó una prueba sanguínea de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en la semana cero (después de seis semanas de exposición a fructosa) y en la semana nueve, posterior a sus respectivos tratamientos en cada grupo. En la semana cero todas las ratas expuestas a fructosa presentaron niveles mayores a 6.5% de HbA1c, por lo que se les considero diabéticas (Naya y Álvarez 2016). En el caso de las ratas control éstas presentaron niveles por debajo de los 6.5% de HbA1c tanto en la semana cero como en la nueve. En los tratamientos de las ratas diabéticas administradas con MF y con el EASC se mostraron reducciones significativas (P= 0.000295568 y P< 0.0001, respectivamente) en los porcentajes de HbA1c en la semana nueve comparado con la semana cero de cada grupo. Además, en la semana nueve de los

tratamientos con MF y EASC no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en comparación con las ratas control (Fig. 23). Indicándonos y confirmándonos el efecto hipoglucemiante del EASC.

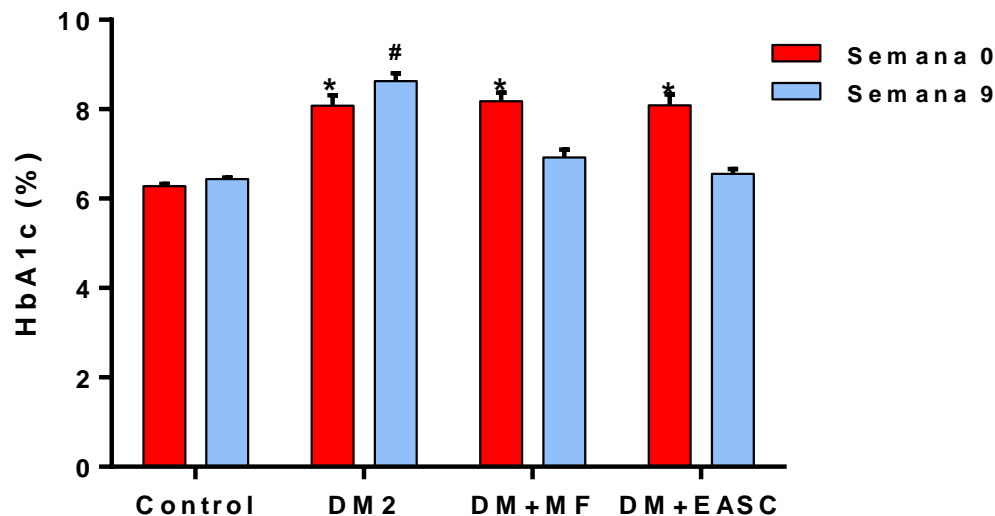


Figura 23. Hemoglobina glicosilada al comienzo y final de los tratamientos. Los datos representan la media \pm EE (n=8). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en la semanas cero respecto al control y los gatos (#) indican diferencias significativas en las semanas nueve respecto al control ($P \leq 0.05$) ANOVA *post hoc* Tukey.

VIII.2 Pruebas de conducta

La prueba de laberinto en cruz elevado (EPMT, por sus siglas en inglés) se usó para medir el comportamiento similar a la ansiedad y el comportamiento exploratorio natural en las ratas. Donde se puede observar que las ratas administradas con el EASC no presentan una conducta ansiosa al no existir cambios significativos en el porcentaje de tiempo y entradas en los brazos abiertos durante la prueba en comparación con las ratas control, sin embargo, existe una diferencia significativa respecto al grupo de ratas diabéticas sin tratamiento, esto atribuido a un estado de salud bueno. En las ratas tratadas con MF se observó una conducta más ansiosa que en las ratas control y las del EASC, ya que existió una diferencia significativa tanto en el porcentaje de tiempo como en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos ($P<0.01$ y $P<0.001$) respectivamente. Mientras tanto en el caso de las ratas diabéticas sin tratamiento se observa un aumento de la conducta ansiosa debido al bajo porcentaje de tiempo y entradas en los brazos abiertos esto en comparación con los demás tratamientos (Fig. 24).

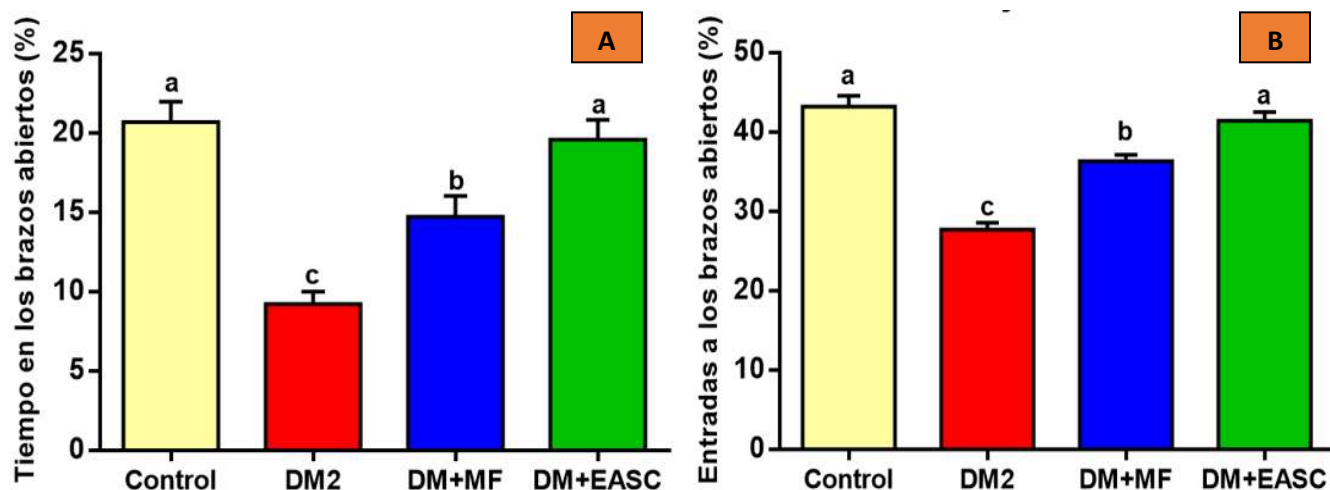


Figura 24. Prueba de laberinto en cruz elevado. Los datos representan la media \pm EE (n=8) y las letras indican diferencias significativas obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$).

Mediante la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NORT, por sus siglas en inglés), se evaluó la memoria y aprendizaje de las ratas (dándonos un índice indirecto de la lesión del hipocampo), donde se observa que las ratas tratadas con el EASC no tienen diferencia significativa con las ratas control, pero si muestran un claro aumento significativo ($P < 0.0001$) en el DI en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento, lo que nos indica que el tratamiento con el EASC inhibe los daños provocados por la DM2 en la memoria a corto plazo y aprendizaje no espacial y por lo tanto en el hipocampo. Las ratas tratadas con MF mostraron un DI menor que las ratas tratadas con el EASC, sin embargo, no existió diferencia significativa entre estos grupos. Mientras que las ratas diabéticas mostraron diferencia significativa ($P < 0.0001$) en comparación con todos los tratamientos, teniendo un índice de discriminación ligeramente arriba 0.5, lo que nos indica que las ratas están reconociendo con dificultad el objeto cambiado, por lo tanto, presentan una memoria a corto plazo y aprendizaje deteriorado provocado por la DM2 (Fig. 25).

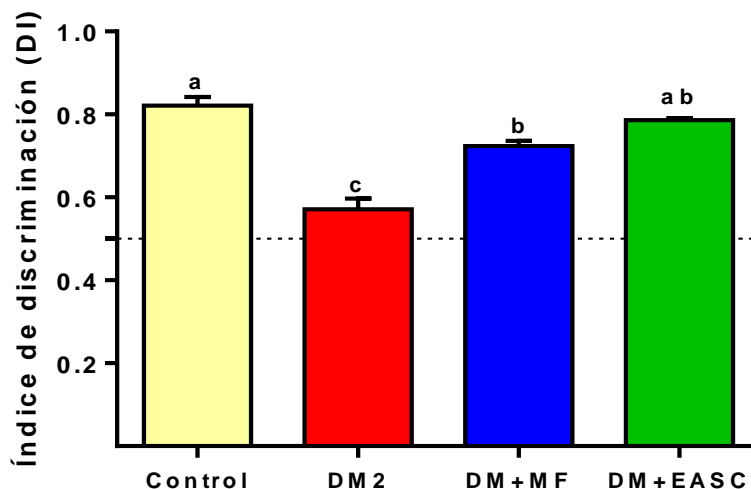


Figura 25. Prueba de reconocimiento de objetos novedosos. Los datos representan la media \pm EE (n=8) y las letras indican diferencias significativas obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$). La línea punteada indica un DI de 0.5.

En la prueba de reconocimiento espacial (SRT, por sus siglas en inglés) con la que se evaluó la disfunción en la memoria topográfica y aprendizaje espacial mediado por el hipocampo en las ratas, se observó que las ratas diabéticas tratadas con el EASC tuvieron un aumento significativo ($P < 0.0001$) en el DI en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento, además de no tener diferencia significativa con el grupo control. Indicándonos que las ratas diabéticas tratadas con el extracto tienen un mejor estado de salud o bien no presentan daño de la memoria y aprendizaje espacial. Las ratas diabéticas tratadas con MF tuvieron una tendencia menor del DI respecto al grupo tratada con el extracto, no obstante, no existió diferencia significativa ($P = 0.6335$) entre ambos grupos. Las ratas diabéticas sin tratamiento presentaron un DI bajo con diferencia significativa ($P < 0.0001$) respecto a los demás tratamientos, incluso por debajo de 0.5 del DI, indicándonos que las ratas no reconocen el objeto que fue cambiado de lugar, considerándose una disfunción de la memoria topográfica y aprendizaje espacial deteriorado como consecuencia de la DM2 (Fig. 26).

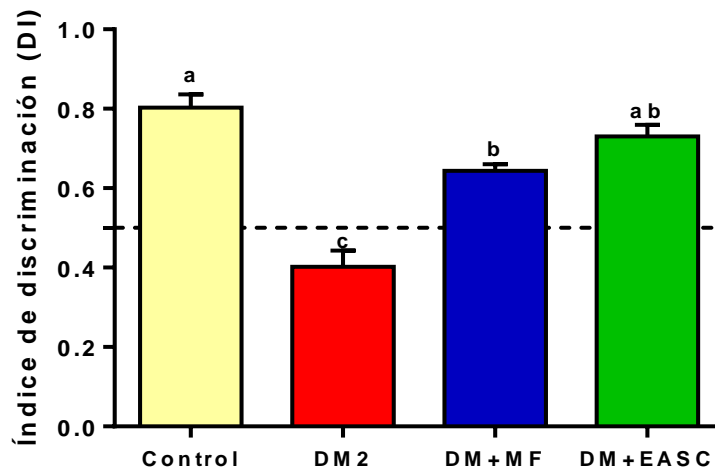


Figura 26. Prueba de reconocimiento espacial. Los datos representan la media \pm EE (n=8) y las letras indican diferencias significativas obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$). La línea puntada indica un DI de 0.5.

VIII.3 Peso corporal y cerebral

La figura 27 muestra los valores de peso corporal de los grupos en las diferentes condiciones experimentales, puede observarse un aumento de peso constante en los animales control, donde este curso temporal del incremento de peso durante el estudio puede interpretarse como mantenimiento de un buen estado de la ingesta de alimento, ausencia de efectos tóxicos del EASC en las ratas a las que se les administró y en general un buen estado de salud. En los grupos de ratas diabéticas administrados con el EASC y con MF, a pesar de presentar una pérdida de peso en la semana cero (después de seis semanas de administración de fructosa) respecto al grupo control como consecuencia o síntoma de la DM2 (Herrera *et al.*, 2012) se observa un aumento constante del peso en ambos grupos, donde a partir de la semana tres no existe diferencia significativa entre el grupo administrado con el EASC y en la semana seis para el grupo administrado con MF, ambos en comparación con el grupo control, indicándonos una mejoría en la salud y desarrollo de los animales de estos tratamientos. A pesar de mostrar un crecimiento más rápido las ratas administradas con EASC en comparación con las del grupo administrado con MF, estos no presentan diferencias significativas en la comparación de pesos corporales por grupo, sin embargo, ambos grupos si muestran diferencias significativas con el grupo control. Mientras que en las ratas diabéticas sin tratamiento se ve una progresión menor del aumento de peso en los animales como consecuencia de la DM2.

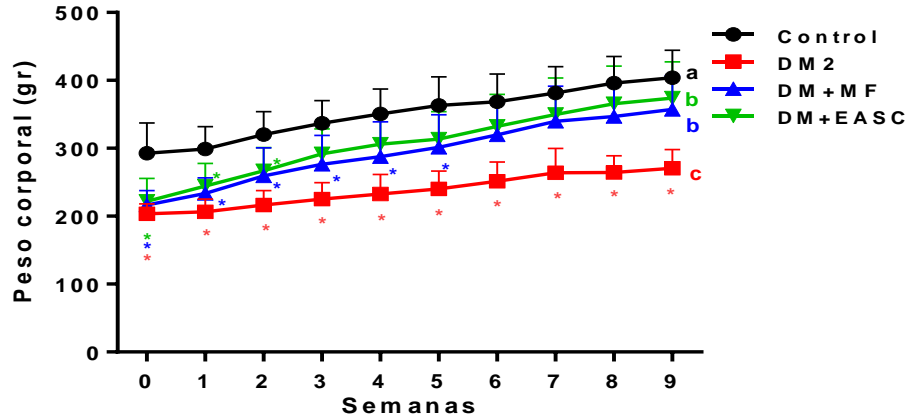


Figura 27. Peso corporal de ratas diabéticas administradas con los diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm EE (n=8). Los asteriscos (*) representan las diferencias significativas de cada grupo en cada semana respecto al grupo control y las letras indican diferencias significativas entre los grupos obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$).

Dadas las reducciones regionales en el volumen cerebral por causa de la DM se decidió evaluar la relación de peso cerebral de las ratas por gramo de peso corporal (Fig. 28 A). No se observó diferencia significativa en la relación peso cerebral - peso corporal de los grupos respecto al control. Sin embargo, se tiene una diferencia significativa ($P = 0.0365$) entre el grupo de ratas diabéticas y las ratas diabéticas administradas con el EASC. También se muestran los pesos netos de los cerebros de las ratas en cada tratamiento (Fig. 28 B), donde las ratas diabéticas tratadas con MF y tratadas con el EASC no tuvieron diferencias significativas respecto al grupo control, en el caso de las ratas diabéticas sin tratamiento se mostró una reducción significativa ($P = 0.0034$) en el peso cerebral neto respecto a los demás tratamientos, indicándonos que los tratamientos con MF y el EASC inhiben las reducciones en el peso cerebral de las ratas con DM2.

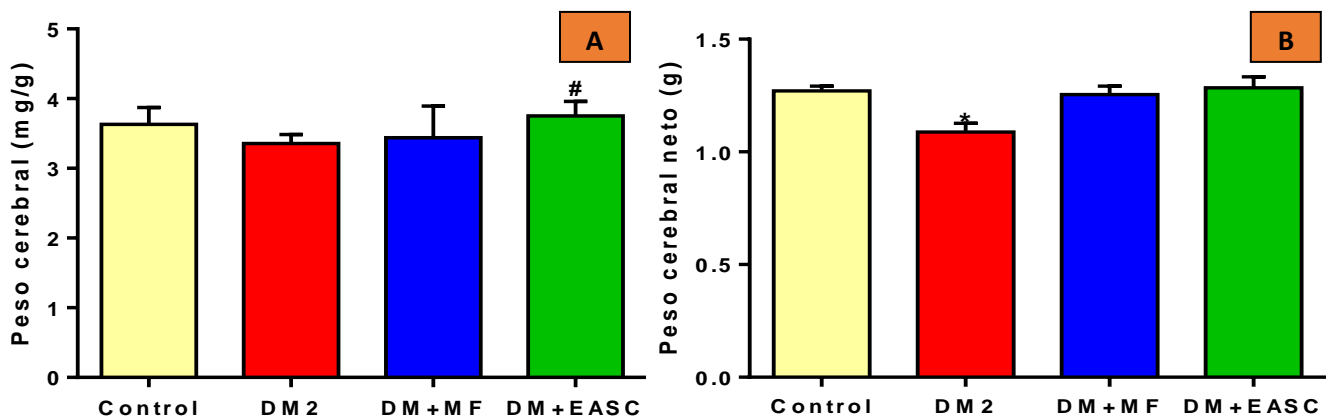


Figura 28. Peso cerebral de ratas macho diabéticas con los diferentes tratamientos. (A) Relación de peso cerebral de las ratas por gramo de peso corporal. (B) Peso neto cerebral de las ratas con diferentes tratamientos. Los datos representan la media \pm EE (n=8). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo control y los gatos (#) respecto al grupo diabético (DM) obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$).

Además de determinar el peso cerebral también se realizaron mediciones del largo y ancho de los cerebros de las ratas con ayuda de un calibrador Vernier, donde se encontró que únicamente las ratas diabéticas sin tratamiento tuvieron una disminución significativa tanto en el largo ($P= 0.0336$) como en el ancho ($P<0.0001$) cerebral, respecto al grupo de ratas control como consecuencia de la DM2 (Fig. 29 A). Mientras que en el largo y ancho de los cerebros no se encontraron diferencias significativas de las ratas diabéticas tratadas con MF y con el EASC en comparación con el control. Interpretando estos resultados, se puede decir que tanto el tratamiento con MF y con el EASC pueden estar inhibiendo las reducciones cerebrales provocadas por la DM2. Se muestran fotografías representativas de los cerebros de cada uno de los tratamientos (Fig. 29 B).

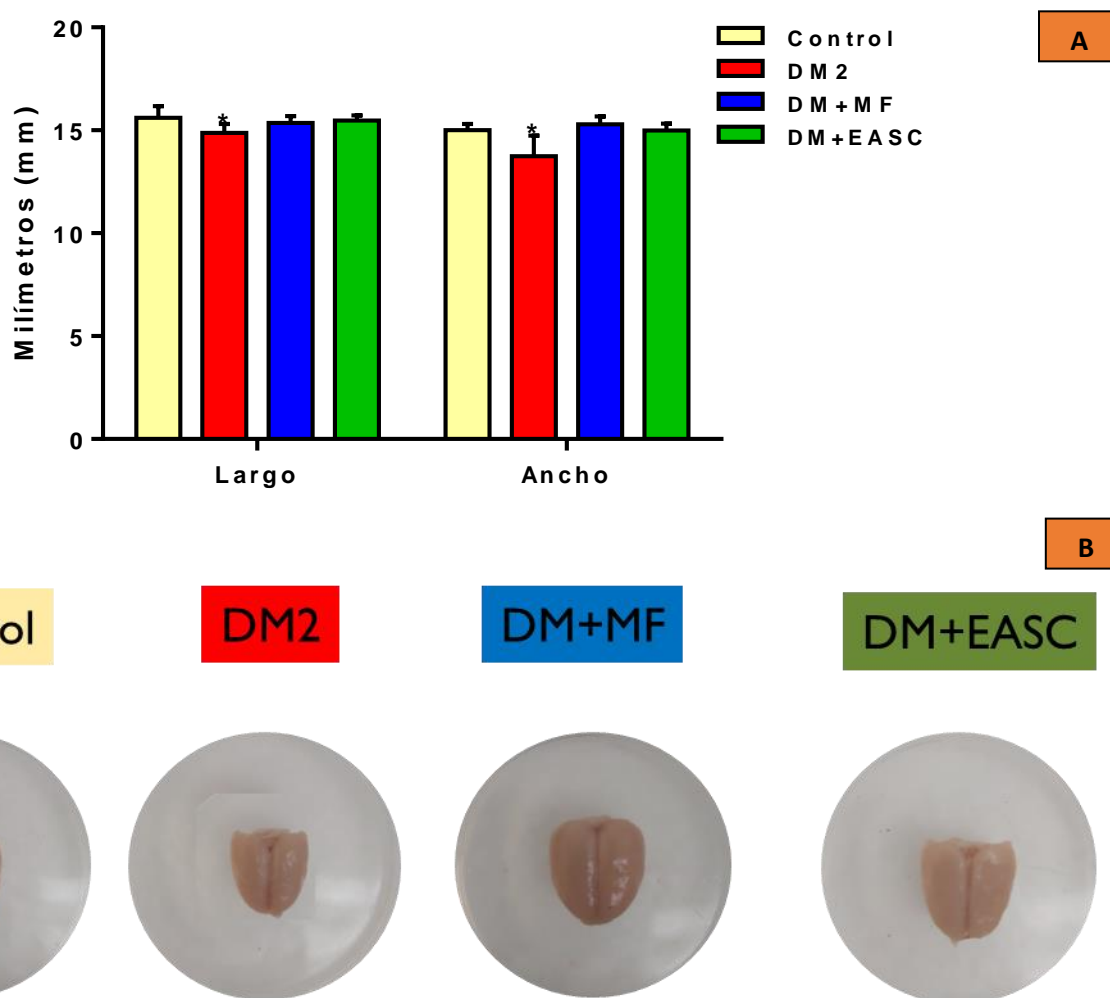
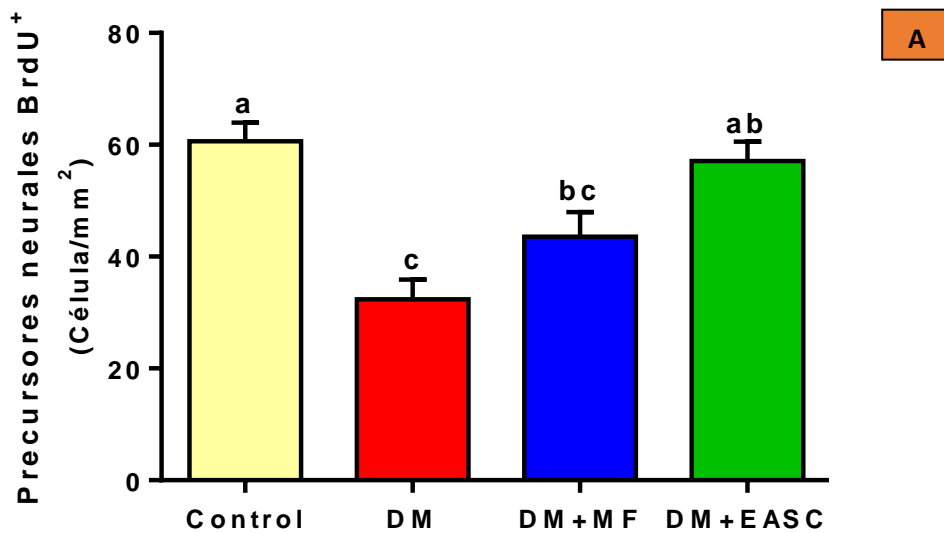


Figura 29. Volumen cerebral de ratas macho diabéticas con los diferentes tratamientos. (A) Volumen cerebral calculado con un calibrador Vernier. **(B)** Fotografías representativas de los cerebros de cada grupo. Los datos representan la media \pm EE ($n=8$), Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo control obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P\leq 0.05$).

VIII.4 Inmunohistoquímica de precursores neurales con BrdU

Los conteos de precursores neurales positivos a BrdU (BrdU⁺) se llevaron a cabo en la zona granular y subgranular del Giro Dentado (GD) en un área delimitada de 150,000 μm^2 (150 mm^2). Los resultados de estos conteos indican diferencias significativas ($P < 0.001$) entre las ratas diabéticas tratadas con el EASC y las ratas diabéticas sin tratamiento, además, las ratas tratadas con el EASC no mostraron diferencias significativas respecto al grupo de ratas control en el número de BrdU⁺, indicándonos que al administrar el extracto a las ratas se aumenta el número de células generadas en esta zona, el cual es disminuido por la DM2, y por lo tanto se restaura el proceso de neurogénesis que es afectado por la enfermedad. Las ratas tratadas con MF mostraron una disminución del número de BrdU⁺ respecto al grupo tratado con el extracto, sin llegar a ser esta disminución significativa. Encontrando que el tratamiento con el EASC brinda mejores resultados que el tratamiento con MF para la neurogénesis normal en el GD, esto a pesar de seguir con el consumo crónico de fructosa. También se puede observar una disminución significativa ($P < 0.001$) de precursores neurales en las ratas diabéticas sin tratamiento en comparación con el grupo control (Fig. 30 A), lo que nos permite confirmar que la DM2 provoca daño en la regeneración de células cerebrales y daños en el proceso de neurogénesis. También en la figura 30 B se muestran microfotografías representativas de las inmunotinciones de los diferentes grupos de ratas con BrdU.



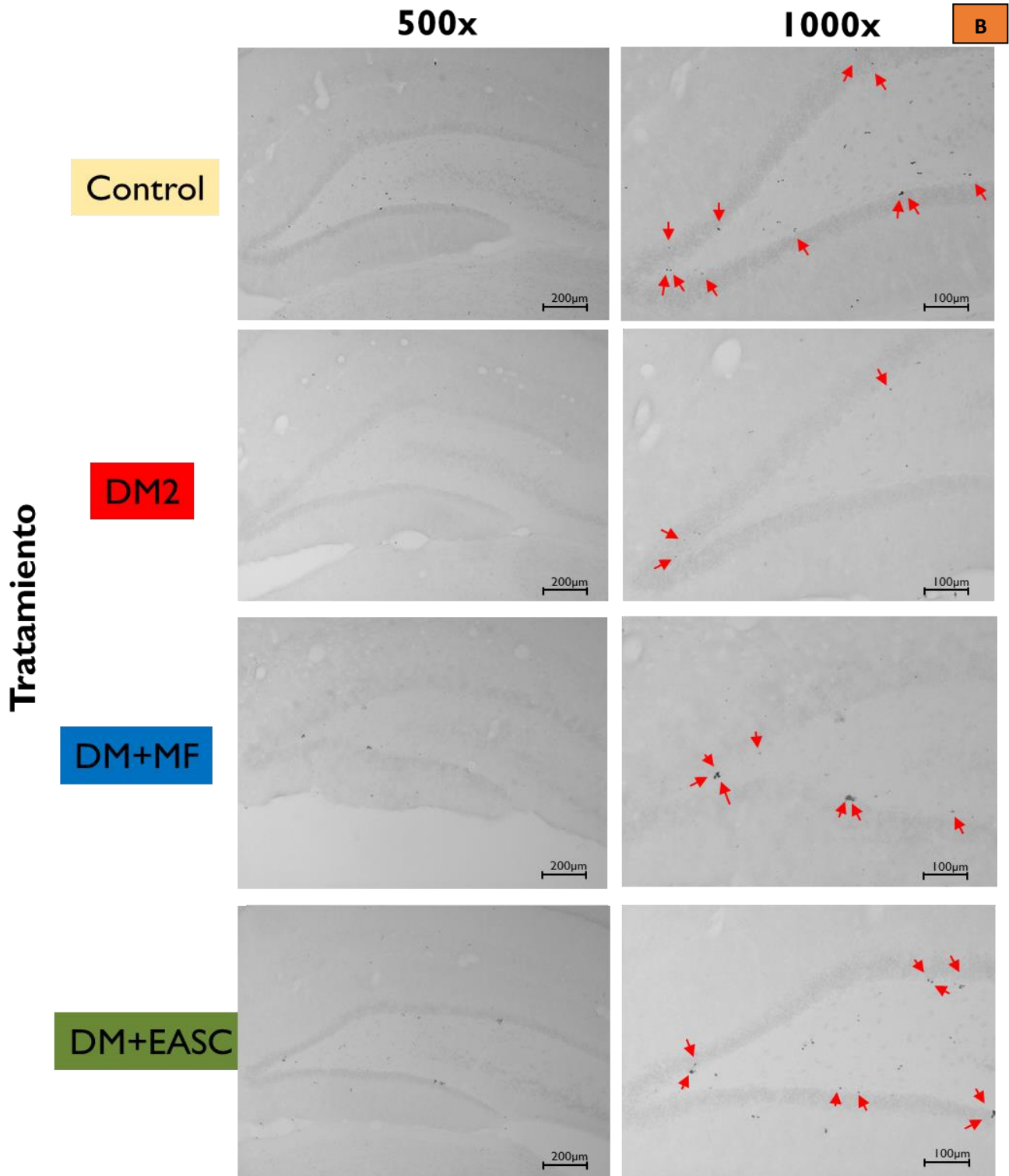
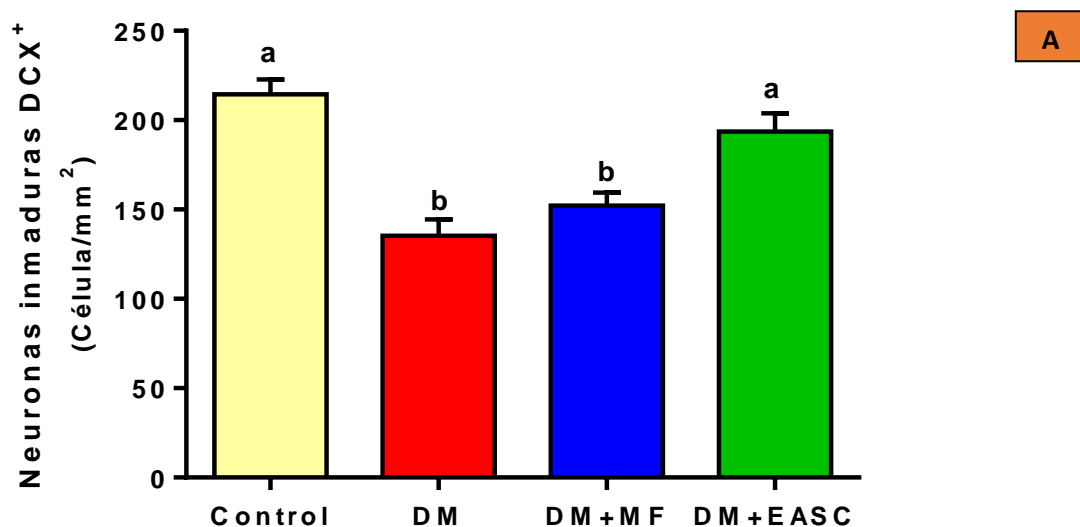


Figura 30. Número de precursores neurales BrdU⁺ en el giro dentado. (A) Número de células positivas a BrdU (BrdU⁺) por mm² en la zona granular y subgranular del GD de las ratas. Los datos representan la media ± EE (n=8), las letras indican diferencias significativas respecto al grupo control obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$). (B) Microfotografías de cortes histológicos del giro dentado del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales en dos diferentes aumentos (500x y 1000x). Las flechas indican los precursores neurales BrdU⁺ en la zona granular y subgranular del giro dentado.

VIII.5 Inmunohistoquímica de neuronas con DCX

Al igual que los conteos de los precursores neuronales, el conteo de las neuronas inmaduras positivas a DCX (DCX⁺) se llevó a cabo en la zona granular y subgranular del GD, indicándonos las células que fueron generadas recientemente y maduraron a neuronas (neurogénesis), logrando sobrevivir éstas por lo menos tres días. Los resultados encontrados fueron que las ratas tratadas con el extracto tuvieron un marcado aumento significativo ($P < 0.001$) en el número de células DCX⁺ respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento así como con las ratas diabéticas tratadas con MF, además de no tener diferencia significativa en comparación con el grupo control. De tal manera se considera que el tratamiento con el EASC aumenta la sobrevivencia y diferenciación de neuronas en el GD. En el caso de las ratas tratadas con MF se observó una disminución significativa ($P < 0.0001$) de neuronas DCX⁺ en comparación con el grupo control, además no existió diferencia significativa de este grupo respecto al grupo diabético sin tratamiento (Fig. 31 A), lo que nos indica de nuevo que la DM2 afecta la generación de células cerebrales y transformación de dichas células a neuronas, además nos indica que el tratamiento con MF es incapaz de detener éstas afectaciones provocadas por la enfermedad. En la figura 31 B se muestran microfotografías representativas de las inmunotinciones en los cortes histológicos de los diferentes grupos de ratas con DCX.



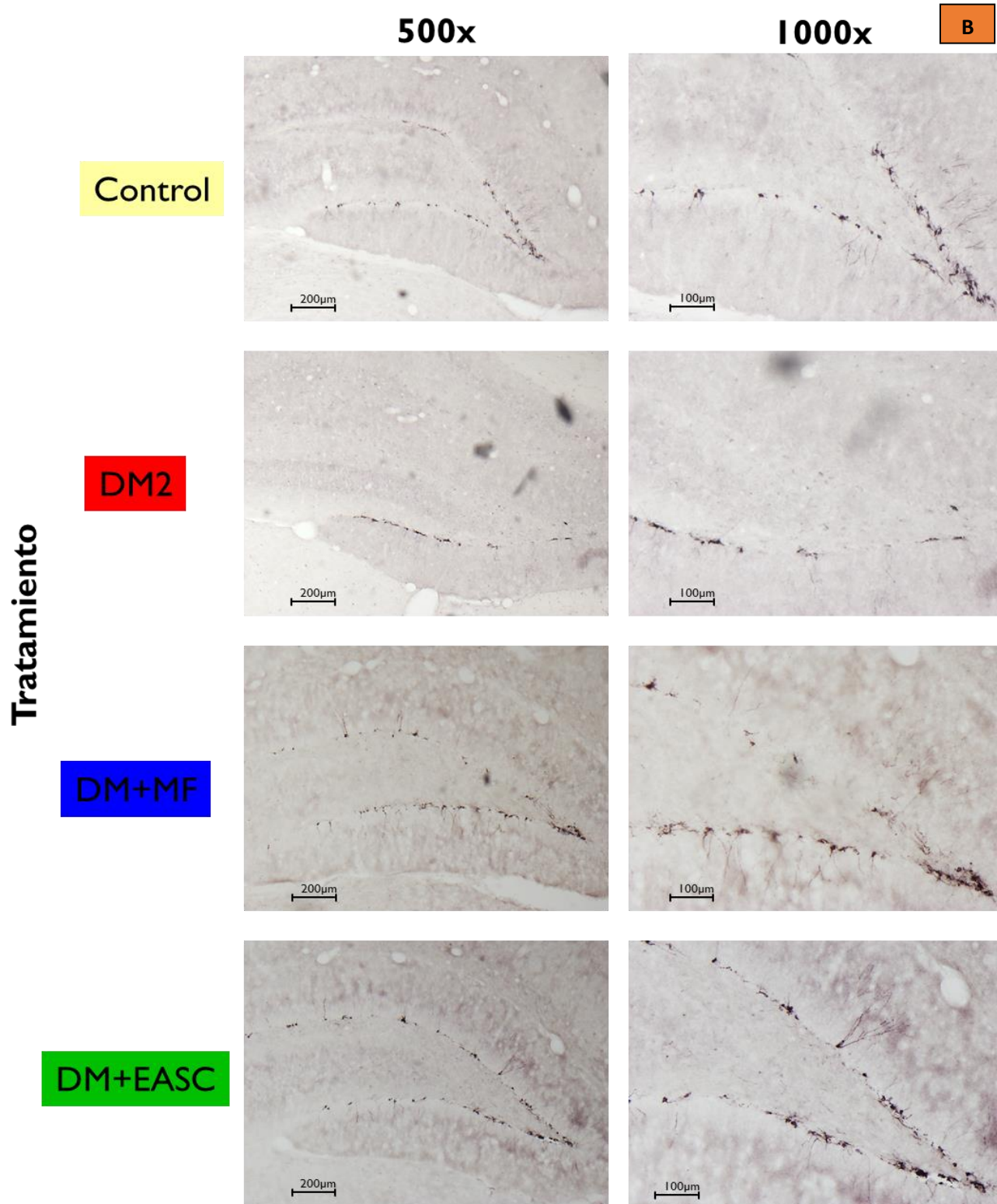


Figura 31. Número de neuronas inmaduras en el giro dentado. (A) Número de células positivas a DCX (DCX^+) por mm^2 en la zona granular y subgranular del GD de las ratas. Los datos representan la media \pm EE (n=8), las letras indican diferencias significativas respecto al grupo control obtenidas de un análisis de varianza (ANOVA) Tukey *post hoc* diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$). (B) Microfotografías de cortes histológicos del giro dentado del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales en dos diferentes aumentos (500x y 1000x).

IX. DISCUSIÓN

Una gran cantidad de personas en todo el mundo padecen de diabetes o está en riesgo de padecer esta enfermedad y sus comorbilidades, donde México se encuentra dentro de los primeros 10 países con mayores índices de diabetes (FID, 2021). Actualmente en muchos países debido a razones socioeconómicas, culturales y otras diversas, las hierbas o plantas medicinales conocidas tradicionalmente se usan comúnmente para la prevención y cura de diversas enfermedades, como la DM2 (Chukwuma *et al.* 2019; Bari *et al.*, 2022). Estas plantas medicinales por su rica composición química muestran una amplia variedad de propiedades farmacológicas, donde estos químicos pueden actuar de manera individual o en conjunto para curar enfermedades y mejorar la salud (Orozco *et al.*, 2019; Hachkova *et al.*, 2021). En las últimas décadas se han vuelto muy populares y de gran interés los polifenoles, encontrados abundantemente en las plantas medicinales, debido a que se ha demostrado que el consumo regular de estos metabolitos secundarios puede reducir el riesgo o bien tratar la DM (Hanhineva *et al.*, 2010; Potì *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Además, los metabolitos secundarios de las plantas son preferidos como fármacos debido a su amabilidad y amplio perfil biológico. Han demostrado ser más eficaces en los sistemas vivos que los compuestos sintéticos (Bari *et al.*, 2022). Las plantas medicinales han ganado popularidad en la medicina por su eficacia como alternativas de tratamientos terapéuticos, por el bajo riesgo a presentar efectos secundarios adversos y por su relativa facilidad para conseguirse (Chukwuma *et al.*, 2019; Willcox *et al.*, 2021), como es el caso de Galeana, la cual puede conseguirse fácilmente dentro del estado de Michoacán, debido a que este árbol se puede encontrar en distintas avenidas, parques y zonas públicas. Otra ventaja de esta planta es que en sus diferentes usos nunca ha sido reportado un efecto secundario grave o efecto tóxico (Wagh *et al.*, 2021; Świątek *et al.*, 2022), ni tampoco existen reportes de efectos secundarios o tóxicos por los polifenoles, principales metabolitos encontrados en las hojas de esta planta (Escamilla, 2019; Renaud y Martinoli, 2019; Lamport y Williams, 2021; Rojas *et al.*, 2023). Con lo anterior, esta planta tiene el potencial de poder ser utilizada para diversos fines, una vez que se realicen estudios toxicológicos completos.

Hasta la fecha existen estudios con diversas partes del árbol de Galeana que reportan diferentes efectos benéficos medicinales, antimicrobianos, antiplaguicidas, insecticidas, entre otros (Ngouela *et al.*, 1988; Ngouela *et al.*, 1991; Amusan *et al.*, 1995; Amusan *et al.*, 1996; Niyonzima *et al.*, 1999; EL-HELA, 2001; Flach, 2005; Ofori *et al.*, 2009; Pianaro *et al.*, 2007; Alarcón, 2014; Kulkarni *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2015; Teinkela *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020). Dentro de la literatura se reporta que Galeana

tiene efectos contra la diabetes, sin embargo, son escasos los estudios que se pueden encontrar de Galeana y su efecto antidiabético, la información que existe reporta que en África el árbol de Galeana es usado común y tradicionalmente contra la diabetes sin tener información o datos científicos de dicho efecto.

Nuestros resultados brindan información innovadora sobre el efecto hipoglucémico que tiene la administración crónica del EASC, debido a la reducción de glucemia desde la primera semana de administración en las ratas diabéticas, siendo más efectivo que el tratamiento con MF, continuando hasta reducirla a un estado normoglucémico en la tercera semana, seguido de un buen control de la glucemia durante las semanas restantes, también este efecto hipoglucémico del EASC se vió reflejado en la reducción en el % de HbA1c al final del tratamiento crónico. Resultados con los cuales estamos brindando información válida de respaldo del efecto hipoglucémico que tiene el tratamiento del EASC en individuos con DM.

Dentro de los pocos estudios existentes del efecto hipoglucemiante de Galeana se encuentra el de Kihdze y colaboradores en 2016 que realizaron un estudio en ratas Wistar, a las que se les administró por vía oral diferentes concentraciones del extracto de la corteza de tallo de Galeana con diferentes solventes y metformina seguida de una carga de glucosa para determinar el porcentaje de reducción de la hiperglucemia en una curva de tolerancia a la glucosa, encontrando que los mejores porcentajes de reducción de la hiperglucemia se mostraban en todas las concentraciones utilizando el extracto acuoso, incluso más que con la metformina. De igual forma Niyonzima y colaboradores en 1990, 1993 y 1999 realizaron curvas de tolerancia a la glucosa en animales sanos y diabéticos utilizando el extracto metanólico y acuoso de la corteza de tallo de Galeana, encontrando que el extracto tenía efectos hipoglucémicos, obteniendo igualmente mejores resultados con el extracto acuoso, tal como Kulkarni y colaboradores en 2014 que encontraron mejores resultados en diferentes pruebas bioquímicas con el extracto acuoso de la planta. Tanayen y colaboradores en 2014 realizaron un ensayo tanto con ratas sanas como con ratas diabéticas a las que se les administró diferentes dosis del extracto metanólico-acuoso de la corteza del tallo de Galeana, donde a comparación de los otros estudios de exposición aguda mencionados, este tuvo una duración mayor del seguimiento de reducción de la glucemia con 18 días, encontrando que todas las concentraciones usadas tenían un efecto hipoglucémico en las ratas, obteniendo mejores resultados con la concentración de 400 mg/Kg, siendo una concentración muy cercana a la utilizada dentro de nuestro grupo de trabajo por Escamilla, 2019 y en este proyecto. Los resultados encontrados dentro de estas publicaciones como los encontrados dentro de este proyecto

demuestran el efecto hipoglucémico de Galeana, que tiene efectos hipoglucémicos similares e incluso mejores a los de otras plantas utilizadas en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo y que cuentan con altas concentraciones de polifenoles, tales como *Andrographis paniculata* (Thakur *et al.*, 2016), *Hedera nepalensis* (Hashmi *et al.*, 2018), *Flos Puerariae* (Liu *et al.*, 2015), *Artemisia macrocephala* (Bari *et al.*, 2022), *Mitragyna speciosa* (Chen *et al.*, 2022), *Securidaca inappendiculata* (Olatunji *et al.*, 2021) y *Teucrium polium* (Mousavi *et al.*, 2015) así como el uso de polifenoles utilizados de forma aislada (Bhutada *et al.*, 2010), moléculas principales a las que se les atribuye este efecto hipoglucémico de Galeana.

Como se puede observar son escasos los estudios que evalúan la actividad hipoglucemiante de Galeana, y los estudios que pueden encontrarse en la literatura utilizan únicamente la corteza del tallo, siendo que ha sido reportado que la mayor cantidad de metabolitos en Galeana se encuentra en la parte aérea, es decir hojas y flores (Ofori *et al.*, 2009; Kulkarni *et al.*, 2014; Escamilla *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020; Wagh *et al.*, 2021; Świątek *et al.*, 2022), por lo que es importante realizar estudios con estas partes de la planta, como en este estudio, debido a un posible mayor efecto hipoglucémico por una concentración más alta de metabolitos, además de ser más fácil conseguir las hojas o flores del árbol. También como fue mostrado anteriormente el extracto acuoso con partes de la planta tiene mejores resultados respecto a extractos con otros solventes, considerando que además es un método más fácil de llevar a cabo y que podría ser utilizado de forma casera, al no requerir exhaustivamente material exclusivo de laboratorio.

El único ensayo reportado con partes aéreas de Galeana es el realizado con el extracto etanólico de flores de Galeana por Bachhav y Saudagar en 2018, donde el extracto de flores demostró una reducción de la glucosa en ratas diabéticas de aproximadamente el 50% en el día 28 con una concentración de 250 mg/kg, mientras que el estudio mencionado anteriormente de Tanayen con el extracto de la corteza del tallo redujo aproximadamente el 33.98% la concentración de glucosa en las ratas al día 18, mientras que en este estudio se obtuvo una reducción del 71.41% en el día 28 (semana 4), obteniendo mejores resultados que con el extracto de flores y corteza del tallo mencionados antes, lo que podría reducir o evitar las complicaciones secundarias de la enfermedad de mejor manera. Es importante recalcar que estas comparaciones pueden tener variaciones debido a las concentraciones del extracto administrado, que aunque son aproximadas pueden variar debido a distintos factores experimentales. Lo que demuestra que se requieren más estudios para poder realizar comparaciones más certeras y que lo mostrado en este proyecto es innovador ya que no existen modelos experimentales que utilicen hojas de Galeana y simulen

un tratamiento crónico y de más fácil alcance para la población en general a dicha enfermedad considerada crónica. Dentro de este proyecto se decidió utilizar la concentración de 300 mg/kg del EASC en base a resultados de nuestro grupo de trabajo (Escamilla, 2019), donde se observó mejores resultados hipoglucémicos con esta concentración.

De igual forma como se muestra en este estudio y otros más (Tanayen *et al.*, 2014; Kihdze *et al.*, 2016; Bari *et al.*, 2022) la metformina y otros fármacos hipoglucémicos tuvieron una tendencia inferior de la reducción de la concentración de glucosa en la sangre respecto a los extractos, por lo que tuvieron un efecto hipoglucémico más potente los extractos de las plantas, a pesar de que en este estudio fue utilizada la concentración de metformina óptima reportada (Cheng *et al.*, 2006) para un tratamiento crónico efectivo, este efecto hipoglucémico más potente por parte de los extractos se puede atribuir a que las plantas medicinales debido a su rica composición química muestran una amplia gama de propiedades farmacológicas multidireccionales y multifactoriales complejas, actuando individualmente o en sinergia para el tratamiento de la DM2 mejorando la salud (Orozco *et al.*, 2019; Hachkova *et al.*, 2021; Alam *et al.*, 2022). Otro punto importante es que ninguno de los extractos de estas plantas ha reportado tener un efecto hipoglucémico grave, sino que todos logran reducir la concentración de glucosa a una concentración menor respecto a la de animales diabéticos o igual a la de los animales control sanos, tal como se muestra dentro de nuestro ensayo.

Un parámetro muy importante para evaluar el control de la glucosa es el porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) este se redujo al final de los tratamientos con el EASC y con la MF respecto al grupo diabético sin tratamiento, hasta alcanzar una diferencia insignificante respecto al grupo control. Estos resultados son similares a los expuestos por Olatunji y colaboradores en 2021. Este resultado aunado a la reducción en la concentración de glucosa proporciona una doble confirmación del efecto hipoglucemiante del EASC en las ratas diabéticas.

Como se puede observar dentro de nuestros resultados los animales expuestos a fructosa mostraron una concentración de glucosa alta (por arriba de 130 mg/dL) (Fig. 22), un porcentaje de HbA1c alto (por arriba de 6.5%) (Fig. 23) y un peso corporal inferior al de los animales control (Fig. 27), por lo que se considera que existió un buen establecimiento de la DM2 en los animales diabéticos al presentar dichos parámetros (Herrera *et al.*, 2012; Naya y Álvarez 2016; Chaudhury *et al.*, 2017; Olatunji *et al.*, 2021), además de confirmar que la diabetes provoca un complejo de trastornos metabólicos.

El modelo elegido en el presente estudio esta basado en el principio de que al existir un nivel elevado de glucosa en la sangre constante y que no es aprovechado, sucede una hiperactividad del páncreas con una secreción de insulina elevada para conservar la glucemia en niveles normales (Ley *et al.*, 2018), provocando posteriormente resistencia a la acción de la insulina y una respuesta compensatoria de insulina inadecuada que a su vez provoca la disminución de la captación periférica de glucosa combinada con el aumento de la producción de glucosa endógena (hepática) hasta que la secreción compensatoria de insulina por las células β pancreáticas finalmente alcanza un máximo y luego se deteriora progresivamente, por lo que existe una alta concentración de glucosa constatemente en los animales provocando la DM2, sus síntomas y complicaciones (Delbosc *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2009; Dupas *et al.*, 2016; Cersosimo *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2018; Olatunji *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022). Además la hiperglucemia crónica da como resultado una necesidad incesante de liberación de insulina que está estrechamente relacionada con la producción de ATP, la respiración mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno, la autooxidación, glicosilación de la glucosa y muerte de las células β , lo que a su vez activa varias vías sensibles a ROS que conducen al estrés oxidativo y una reducción de la masa de los islotes pancreáticos o, en un caso extremo, la pérdida total de la producción de insulina (Wang *et al.* 2017, Infante y Garcia *et al.* 2019; Andrade *et al.* 2020; Olatunji *et al.*, 2021).

La incapacidad de las células β para secretar insulina en la DM aumenta el catabolismo y la gluconeogénesis, lo que da como resultado una reducción del peso corporal debido a la pérdida de almacenamiento de grasa (Infante y Garcia *et al.* 2019; Chen *et al.*, 2022). Por lo que la DM2 produce perdida de peso, la cual fue notable en los animales expuestos a la fructosa (Fig. 27), tanto en nuestro proyecto como en el de Olatunji, Pang y Chen quienes utilizaron una administración de fructosa similar a la de nosotros para la inducción de DM, sin embargo, el peso comenzó a ser recuperado y normalizado una vez que se comenzó a administrar los tratamientos, tanto con el extracto como con la metformina dentro de nuestro proyecto. Esto se ha sido reportado en otros estudios como el de Bachhav, que admistro el extracto etanólico de flores de Galeana a las ratas, el cual aumento el peso corporal de los animales respecto al grupo de animales diabéticos sin tratamiento, sin embargo el peso no deajo de presentar diferencia significativa en comparación con el grupo control sano. Este mismo efecto sucedió de acuerdo a lo reportado por Liu quien utilizó el extracto de la planta *Flos Puerariae*, por Bari quien uso el extracto de la planta *Artemisia macrocephala* y Olatunji y Pang con el extracto de *Securidaca inappendiculata*, donde todas estas plantas reportan un contenido alto de polifenoles. A comparación de estos resultados,

en los nuestros se llegó a no tener diferencia significativa respecto al grupo control, al igual que en lo reportado por Chen quien utilizó el extracto de hoja de *Mitragyna speciosa*. Esta diferencia de la recuperación del peso no puede variar por el tiempo de administración de los extractos ya que Bachhav y Bari administraron durante 28 días únicamente dicho extracto, mientras que Liu (2015) lo administró durante 10 semanas y Chen durante 5 semanas, en nuestro proyecto fue una administración durante más tiempo, sin embargo, para la semana 4 (día 28) las ratas habían dejado de presentar diferencia significativa en el peso corporal respecto al grupo control (Fig. 27). Por lo que puede considerarse un efecto mayor cuando se utiliza el EASC o bien cuando son utilizadas las hojas para preparar los extractos. Bhutada administró únicamente quercertina, un flavonoide, a los animales en diferentes concentraciones durante 30 días, donde en este caso los animales diabéticos administrados con el flavonoide lograron normalizar su peso respecto a los animales control. Por lo que este efecto de normalización de peso se puede atribuir a la presencia de los polifenoles en los extractos, además de que estos brindan mejores resultados cuando se trata de un extracto acuoso con hojas, como se observa en nuestros resultados y en los reportados por nuestro grupo de trabajo (Escamilla, 2019). Dentro de estos estudios mencionados, únicamente Bari utilizó MF como control positivo, que al igual que en nuestros resultados este llegó a normalizar el peso corporal respecto a los animales sanos.

Además estos estudios, excepto el de Olatunji, mencionan que durante el tiempo de experimentación los animales diabéticos no mostraron un decremento en la ingesta de alimento. En el caso de Olatunji los animales expuestos a la fructosa disminuyeron la ingesta de alimento y aumentaron la ingesta de agua después de administrar la fructosa, pero la ingesta de alimento se reestableció conforme pasó el tiempo de la administración del extracto de la planta, en nuestro proyecto se observó este mismo comportamiento, donde por tal razón en ambos estudios los animales diabéticos pudieron recuperar su peso, llegando a presentar un peso corporal igual al de los animales control, indicativo de una mejoría de salud. Dentro de nuestros estudios los animales diabéticos tuvieron una reducción de la ingesta de alimento del 33.43% respecto a los animales control, mientras que los animales diabéticos de Olatunji tuvieron una reducción del 41%. Este comportamiento mostrado en ambos proyectos puede deberse al modelo experimental utilizado, ya que al administrar fructosa constantemente a los animales se cumple más rápidamente su ingesta calórica diaria necesaria, provocando que los animales se sientan satisfechos y no consuman una cantidad de alimento similar a la de los animales control, esto sumado a las consecuencias de la enfermedad provoca un aumento de peso corporal menor al de los demás tratamientos. Aunque si bien este decremento en la ingesta de alimentos existe en los animales expuestos

a fructosa, tal comportamiento comienza a ser erradicado una vez que se empieza a dar el tratamiento con el EASC o MF, a pesar de seguir con el consumo crónico de fructosa, por lo que el retraso en el aumento de peso no puede ser atribuido solamente al modelo experimental sino como un síntoma normal de la enfermedad.

La ansiedad y la depresión constituyen un riesgo social relativamente alto y una alta tasa de suicidio (Gerhard *et al.*, 2016) y la incidencia de estos dos trastornos psiquiátricos es 2-3 veces mayor en pacientes diabéticos en comparación con personas normales (Zanoveli *et al.*, 2016; Franquez *et al.*, 2023). La hiperglucemia induce inflamación, estrés oxidativo y apoptosis en el cerebro, específicamente en la zona del hipocampo, así como alteraciones de neurotransmisores (dopamina y serotonina), neurotrofinas (BDNF), mecanismos de señalización celular (AKT y IGF-1), lo que resulta en trastornos neurológicos tal como la ansiedad y la depresión (Ho *et al.*, 2013; Patel y Udayabanu, 2014). Como se menciona la hiperglucemia provoca inflamación y por lo tanto el incremento de ciertas citosinas proinflamatorias y cortisol amentando a su vez la degradación de triptófano en la vía quinurenina, induciendo enzimas limitantes de la velocidad, la indoleamina dioxigenasa (IDO) y la triptófano 2-3, dioxinosa (TDO), lo que da como resultado concentraciones más bajas de triptófano y más altas de quinurenina. La serotonina, implicada en la fisiopatología de la ansiedad y la depresión, es producida por el triptofano, donde la DM al disminuir la capacidad de formar triptofano disminuye también la producción de serotonina cerebral, provocando un aumento de ansiedad y depresión. Además, se sugiere que algunos de los metabolitos adicionales más adelante en la vía de la quinurenina, como el ácido quinolínico, tienen un impacto negativo adicional en el hipocampo en términos de neurogénesis reducida e inducción de apoptosis (Berg y Riise, 2015). Uno de los enfoques terapéuticos más buscados para el tratamiento de la hiperglucemia y sus complicaciones resultantes es mantener una concentración de glucosa en sangre adecuada, lo que posteriormente puede limitar la generación de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo, un factor importante implicado en las complicaciones diabéticas, incluyendo ansiedad y depresión (Olatunji *et al.*, 2021; Franquez *et al.*, 2023).

El laberinto en cruz elevado (EPMT) se considera un modelo animal de ansiedad etiológicamente válido porque utiliza estímulos naturales, como el miedo a un espacio abierto novedoso y miedo a hacer equilibrio en una plataforma elevada relativamente estrecha que puede inducir ansiedad en los humanos (Patro *et al.*, 2016). Por lo cual se decidió realizar tal prueba, para evaluar la conducta similar a la

ansiedad en las ratas. Las pruebas EPMT se llevaron a cabo correctamente de acuerdo a lo descrito por diferentes estudios (Walf y Frye, 2007; Komada *et al.*, 2008; Patro *et al.*, 2016; Hashmi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022). Como se muestra en nuestros resultados las ratas diabéticas sin tratamiento mostraron una conducta más ansiosa confirmando que el aumento a largo plazo de la concentración de glucosa desempeña un papel en la aparición de complicaciones cognitivas y conductuales relacionadas con la diabetes. Además, este efecto de ansiedad en las ratas diabéticas puede ser atribuido a que la DM2 reduce progresivamente el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), relacionado con la densidad neuronal en el hipocampo, afectando a su vez el aprendizaje y la memoria (Aksu *et al.*, 2012). Hecho que fue revertido al administrar las ratas con el EASC, con el cual se obtuvo muchos mejores resultados que con el tratamiento con MF. Se cree que la aversión de los roedores a explorar los brazos abiertos del laberinto se debe al miedo a los espacios abiertos y elevados (Komada *et al.*, 2008). Por lo tanto, se puede predecir que debido al tratamiento con EASC, la aversión natural de las ratas a las áreas abiertas y elevadas disminuyó y mejoró su comportamiento exploratorio espontáneo natural y por lo tanto redujó el comportamiento similar a la ansiedad en los animales, así como muy posiblemente incrementar a concentraciones normales del IGF-1, lo que queda para ser estudiado posteriormente. Nuestros resultados son consistentes con otros encontrados en la literatura donde se utilizaron extractos de plantas con alto contenido de polifenoles, tales como *Brassica juncea* (Thakur *et al.*, 2013), *Hedera nepalensis* (Hashmi *et al.*, 2018), *Mimosa pudica* L. (Patro *et al.*, 2016), *Urtica dioica* (Patel *et al.*, 2018) y *Mitragyna speciosa* (Chen *et al.*, 2022), así como cuando se administró quercertina a ratas diabéticas (Bhutada *et al.*, 2010). Sobre todo se puede hacer una comparación más precisa de nuestros resultados con los estudios realizados por Patel (2018) y Chen, ya que utilizaron las hojas de las plantas para realizar su extracto acuoso, además de que en el caso de Chen utilizaron un modelo experimental similar al nuestro con la administración de fructosa, donde en ambos casos, al igual que en nuestros resultados, los animales diabéticos normalizaron su comportamiento ansioso al no mostrar diferencias significativas tanto en el tiempo como en el número de entradas con el grupo control. Ambos resultados se pueden atribuir a que la presencia de polifenoles inhibe la resistencia a la insulina por el incremento de receptores de insulina cerebrales además de mejorar la entrada y metabolismo de glucosa en las células por el incremento del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), GLUT4, y la activación de las vías PI3K/AKT y BDNF/TrkB, así como inducir la mitogénesis (MAPK1) y reducir los productos de glicación avanzada, además de regular a la baja la expresión de moléculas proinflamatorias y proapoptóticas tal como lo sugieren los resultados mostrados por Patel (2018) y Chen, donde todo esto

mejora a su vez la integridad y funciones del hipocampo, ya que se ha documentado que el comportamiento depresivo y ansioso depende de la integridad y función de las células del hipocampo (Ge *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Contrario a nuestros resultados Patel administró rosiglitazona (un fármaco antidiabético) a los animales diabéticos, los cuales no mostraron diferencia con su grupo control, mientras que en nuestros resultados las ratas tratadas con MF mejoraron su conducta, pero esta no llegó a ser insignificante respecto al grupo control (Fig. 24).

Estudios preclínicos han documentado y explicado las deficiencias en el aprendizaje y la memoria, llevadas a cabo por el hipocampo, incluida la memoria espacial y los déficits de retención de la memoria en roedores y humanos con diabetes (Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020; Bahramsoltani *et al.*, 2021). Una asociación entre la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, ha sido bien establecida y asociada con un riesgo 1.5 a 3 veces mayor en el deterioro de la función cognitiva (Kamal *et al.*, 2000; Grimmig *et al.*, 2017). De tal forma la concentración elevada de glucosa durante mucho tiempo juega un papel clave en la aparición de complicaciones conductuales y cognitivas asociadas con la diabetes debido al estrés oxidativo, muerte celular, desarrollo neuronal y la formación de la memoria, además de otras complicaciones, que conducen a patologías más graves como la enfermedad de Alzheimer y las complicaciones relacionadas. Por lo mencionado anteriormente se decidió realizar una evaluación del estado de la memoria a corto plazo y aprendizaje no espacial en las ratas, mediante la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (NORT), ya que el comportamiento de exploración de objetos es fácilmente cuantificable y permite el estudio de recuerdos de tipo episódico en roedores. Los roedores exhiben una propensión natural a explorar objetos novedosos y no amenazantes y, por lo tanto, es por eso que durante la sesión de prueba, los roedores muestran una preferencia por explorar el objeto nuevo más que el familiar, donde se considera que una preferencia baja por objetos nuevos durante la sesión de prueba es indicativo de una memoria de objetos deteriorada y por lo tanto un hipocampo lesionado. La ventaja de esta prueba es que no requiere ninguna motivación externa, entrenamiento, recompensa o castigo, por lo que no genera ningún estrés (Cohen y Stackman, 2015) ni un estímulo ambiental y por lo tanto no interfirió con el análisis posterior de neurogénesis, que se ha demostrado puede incrementarse o disminuirse por dichas acciones, así como por factores neurotróficos, neurotransmisores, factores de crecimiento, depresión, drogas, envejecimiento y ejercicio físico (Epp *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2022).

Las ratas diabéticas sin tratamiento mostraron un índice de discriminación (DI) disminuido respecto al grupo control y por lo tanto un déficit de memoria de reconocimiento y aprendizaje evidente por la incapacidad para reconocer objetos explorados previamente y objetos novedosos en NORT. Ya que ha sido reportado por otros estudios que los roedores al tener concentraciones altas de glucosa constantemente y resistencia a la insulina afecta la señalización de la insulina afectando aguas abajo el desarrollo neuronal y la formación de memoria (Agrawal *et al.*, 2011; Hölscher, 2011). Donde estos resultados presentados fueron observados de igual manera en los estudios realizados por Ahmed (2019), Farajpour, Patel (2018) y Bari, confirmando lo reportado en la literatura sobre el deterioro de memoria y aprendizaje provocado por la DM. Además los estudios en roedores y primates revelaron que el proceso de memoria de reconocimiento de objetos visuales depende de la integridad y las funciones del hipocampo (Hammond *et al.* 2004; Antunes y Biala 2012), también mencionado en humanos (Kitabatake *et al.*, 2007; Foghi y Ahmadpour, 2013; Sadeghi *et al.*, 2016; Fogwe *et al.*, 2021). En el presente estudio, el tratamiento crónico con el EASC o MF revirtió significativamente el déficit de memoria de reconocimiento asociado con la diabetes crónica, obteniendo mejores resultados con el tratamiento del extracto (Fig. 25). De igual forma Farajpour con el extracto de *Rosa canina*, Patel (2018) con el extracto de *Urtica dioica* y Bari con el extracto de *Artemisia macrocephala*, todas estas plantas con un contenido alto de polifenoles, obtuvieron resultados en los que sus animales diabéticos a los que administraron los extractos no mostraron deterioro de la memoria y aprendizaje, ya que no mostraron diferencia significativa en el DI respecto a sus grupos control. Dentro de estos estudios Bari y Patel utilizaron los fármacos hipoglucémicos de MF y rosiglitazona respectivamente como controles positivos para sus grupos, donde ambos fármacos también lograron inhibir el deterioro de la memoria y aprendizaje, tal como lo encontrado en nuestro proyecto donde se utilizó MF. Lo que nos da un índice indirecto de que el tratamiento con el EASC y MF inhibe el daño en la integridad y la funcionalidad del hipocampo. Estos resultados pueden ser atribuidos a una mayor expresión de BDNF y TRKB, entre otras moléculas en el hipocampo ya mencionadas dentro de la prueba EPMT de acuerdo a lo reportado por Patel (2018), que como se mencionó anteriormente son factores neurotróficos que activan diversas vías de neuroprotección y la expresión de estos es aumentada por la presencia de los polifenoles en las ratas, por lo que muy posiblemente este sucediendo este efecto dentro de nuestro proyecto, mejorando así la memoria y aprendizaje de las ratas diabéticas administradas con el EASC con un alto contenido de polifenoles. Lo anterior, queda por ser demostrado posteriormente.

Como fue mencionado anteriormente la DM provoca daños y deterioro en la memoria topográfica y aprendizaje espacial (Li *et al.*, 2017; Havolli *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020; Bahramsoltani *et al.*, 2021). Donde se ha demostrado que este tipo de memoria está mediada por el hipocampo en humanos (Hammond *et al.* 2004; Havolli *et al.*, 2017). Por lo que dentro de nuestro ensayo se decidió utilizar la prueba de reconocimiento espacial (SRT) la cual sirve para evaluar estos parámetros en los roedores, las ventajas de esta prueba, al igual que NORT, es que no requiere ninguna motivación externa, entrenamiento, recompensa o castigo, por lo que no genera ningún estrés (Cohen y Stackman, 2015) y por lo tanto no interfiere con el análisis posterior de neurogénesis, contrario a la prueba de Morris la cual es más comúnmente utilizada, que requiere de fase de adquisición, prueba y seguimiento, donde los roedores deben caminar, nadar, entre otras actividades locomotoras dentro del laberinto acuático, varias veces al día durante diferentes días, además de trabajar la memoria topográfica y no topográfica durante la prueba, así como la memoria espacial y no espacial, donde se ha reportado que someter a los roedores a esta prueba incrementa en más del doble la neurogénesis en los animales (Buthada *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Thakur *et al.*, 2016; Hashmi *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2021).

Dentro de nuestros resultados en la prueba SRT se puede observar que las ratas diabéticas sin tratamiento no alcanzaron ni el 0.5 del DI, indicando que las ratas no reconocieron al objeto idéntico que fue cambiado de lugar respecto a los objetos fuera de la caja, por lo que se interpreta que las ratas tuvieron un deterioro en su memoria topográfica y aprendizaje espacial (Fig. 26). Lamentablemente, no se encontró ningún ensayo donde haya sido utilizada la prueba SRT en roedores que hubieran sido tratados con algún extracto de la planta. Por lo que únicamente se puede tomar como comparativas trabajos donde utilizaron el laberinto de Morris como prueba de memoria y aprendizaje espacial, tal es el caso de los estudios hechos por Pang, Liu (2015), Hasmi y Thakur (2016), donde todos ellos utilizaron animales diabéticos sin tratamiento, los cuales obtuvieron puntajes más bajos en esta prueba, al igual que nuestros animales diabéticos sin tratamiento, interpretándose que la DM provoca daños en la memoria topográfica y aprendizaje espacial, lo que indirectamente también nos indica que existen daños en el hipocampo. Sin embargo, tanto en nuestros resultados, como en los de ellos, los puntajes en las pruebas aumentaron con el tratamiento de los extractos de plantas ricos en polifenoles, donde al menos dentro de nuestro estudio el EASC brindó un DI mayor que la MF. Lo que nos indica tanto en esta prueba, como en las otras realizadas en nuestro ensayo que la concentración excesiva de glucosa, la resistencia a la insulina y los

demás efectos secundarios de la DM, dañan la integridad y funcionalidad del hipocampo, afectando a su vez el comportamiento, la cognición, la memoria y el aprendizaje de los roedores.

Diversos estudios en adultos con DM muestran reducciones regionales en el volumen cerebral (den Heijer *et al.*, 2003; Espeland *et al.*, 2013; Biessels *et al.*, 2014; Moulton *et al.*, 2015; Infante y Garcia *et al.* 2019). Los estudios en adultos (20 a 60 años) con DM han utilizado métodos de segmentación automatizados para demostrar reducciones modestas en el volumen cerebral en comparación con los sujetos control. Un estudio informó una reducción general del 7% en el volumen de materia gris (Hughes *et al.*, 2013). Estudios han relacionado directamente las alteraciones del volumen cerebral con el funcionamiento cognitivo, provocando la desaceleración de la velocidad de procesamiento de la información, la reducción de la atención, puntuaciones más bajas de las subpruebas de coeficiente intelectual, afectaciones en los dominios de inteligencia general, velocidad psicomotora, flexibilidad mental, memoria, aprendizaje, entre otras, donde un control metabólico deficiente, reflejado por la hiperglucemia crónica, mayor resistencia a la insulina, eventos hipoglucémicos y mayor duración de la enfermedad sugiere que la exposición a largo plazo a los factores de riesgo relacionados con la diabetes es especialmente dañina para el cerebro (Biessels *et al.*, 2014; Biessels y Reijmer, 2014). Esto puede deberse a la interacción de la DM con procesos como la poda neuronal y el crecimiento neuronal, lo que da como resultado regiones de volumen cerebral disminuido (Marzelli *et al.*, 2014). La reducción en el volumen cerebral es comparable con 3-5 años de envejecimiento normal, siendo hasta tres veces más que la tasa de atrofia del envejecimiento normal. La pérdida de tejido cerebral se refleja más claramente en la zona de los ventrículos, lo que indica que la atrofia asociada a la DM2 es más pronunciada en las regiones que rodean los ventrículos, como la zona del hipocampo (den Heijer *et al.*, 2003; Gold *et al.*, 2003; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; 2014; Biessels y Reijmer, 2014; Moulton *et al.*, 2015). Además, dada la asociación entre la DM y la EA, se ha prestado mucha atención al hipocampo ya que se ha reportado una reducción del volumen del hipocampo en pacientes con DM2. Los procesos patológicos que conducen a la atrofia cerebral además de la pérdida neuronal (Gold *et al.*, 2003), son también la pérdida de axones y células gliales, la rarefacción y encogimiento de la sustancia blanca, la arteriolosclerosis y la colagenosis venosa pueden producir cambios en el volumen cerebral (Biessels y Reijmer, 2014; Musen *et al.*, 2018).

Además de estos reportes de reducciones cerebrales en humanos con DM, también existen estudios en roedores que han encontrado disminuciones en el volumen cerebral provocados por la DM. Donde se ha reportado que existe una relación positiva entre el nivel de gravedad de la enfermedad y el nivel de reducciones cerebrales (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; 2014; Pang *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022), donde ellos además de pesar el cerebro, también evaluarón el grosor y adelgazamiento hipocampal (incluyendo las zonas del GD, CA1, CA2 y CA3) mediante la tinción con violeta de cresilo, encontrando una reducción significativa en los animales diabéticos respecto a los animales control (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; 2014). Esta información, sumada a lo reportado en la literatura nos permite pensar que las reducciones en el peso cerebral son provocadas principalmente por un deterioro y reducción en la zona ventricular y por lo tanto en el hipocampo. Las reducciones en el peso cerebrales coinciden con nuestros resultados, donde se observó una reducción en el peso cerebral neto de las ratas diabéticas en comparación con las ratas control y tratadas con el EASC y MF. Posiblemente debido a que las ratas diabéticas sin tratamiento mostraron continuamente concentraciones elevadas de glucosa, tuvieron en consecuencia un menor peso cerebral neto, confirmando que entre mayor sea la gravedad de la enfermedad existirán mayores reducciones cerebrales.

Además como se menciona y se observa en las fotografías representativas mostradas por Ramos-Rodriguez (2013 y 2014) en los animales diabéticos existe una marcada disminución en el ancho cerebral, a pesar de no haber realizado mediciones cerebrales a la altura de la zona ventricular donde se encuentra el hipocampo, así como una reducción del grosor del hipocampo, lo que nos indica que existe una similitud con nuestros resultados donde al realizar mediciones con el calibrador Vernier se mostró una notable disminución significativa del ancho y largo cerebral, menos notable pero significativa, respecto a los animales control y los tratados con el EASC y MF.

En nuestro ensayo se evaluó la relación peso cerebral - peso corporal para determinar si existía alguna diferencia entre dicha relación entre los tratamientos, obteniendo como resultados que ningún tratamiento mostró diferencias significativas respecto al grupo control, esto puede explicarse debido a que la DM afecta a todo el organismo (Cervantes y Presno, 2013), ya que la hiperglucemia crónica y persistente tiene una fuerte correlación positiva con la disfunción a largo plazo y el fallo de diferentes órganos del cuerpo, donde estas complicaciones secundarias en los órganos representan la mayoría de las muertes asociadas con la diabetes (Olatunji *et al.*, 2021), por lo que también se muestra una reducción general de peso corporal en los animales diabéticos, provocando disminuciones de desarrollo en todos

los órganos, tal como el cerebro y es por eso que las ratas diabéticas muestran una relación peso corporal - cerebral sin diferencia con el grupo control, a pesar de sí mostrar una reducción del peso cerebral neto. Sin embargo, las ratas tratadas con el EASC mostraron un aumentó en dicha relación respecto al grupo diabético, por lo que se puede decir también que la DM si afecta un poco más la disminución del peso cerebral respecto al peso corporal sin llegar a ser este notorio o significativo.

Existen muy pocos reportes donde hayan utilizado extractos de plantas con alto contenido de polifenoles que hayan evaluado el peso cerebral de los animales diabéticos. Los únicos ensayos encontrados fueron los de Bari con el extracto de *Artemisia macrocephala* y el de Pang con el extracto de *Securidaca inappendiculata* quienes al igual que nosotros obtuvieron en sus resultados que al administrar sus respectivos tratamientos con los extractos, los animales diabéticos dejaron de presentar una perdida en el peso cerebral al no mostrar diferencia significativa respecto a los grupos control pero sí un aumento respecto a los grupos diabéticos sin tratamiento.

Los resultados mostrados en el presente trabajo sobre la evaluación de los volúmenes (largo y ancho) cerebrales de animales diabéticos sin tratamiento y tratados con MF y el EASC son un aporte importante e innovador al conocimiento sobre las reducciones cerebrales provocadas por la DM y su tratamiento, ya que no fueron encontrados reportes donde se haya evaluado dicho parámetro en animales tratados con extractos de plantas ni en animales con DM, por lo que no fue posible realizar comparaciones de dichos resultados. También es importante destacar que en nuestro ensayo todos los cerebros fueron cortados a la altura del cerebelo, como se muestra en la figura 29 B, para evitar variaciones en el peso y mediciones cerebrales por este factor, además todos los cerebros fueron pesados y medidos inmediatamente después de extraerlos de las ratas.

Como se sabe la neurogénesis adulta ocurre en dos áreas principales del cerebro dentro del hipocampo, la zona subventricular y el giro dentado (GD) (Lang *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2013; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2014). La neurogénesis en los mamíferos, que continúa durante toda la vida, ayuda a reemplazar las neuronas en el DG del hipocampo que posteriormente son integradas en las redes neuronales desempeñado un papel en las funciones de la memoria, cognición, aprendizaje, entre otras funciones (Shin *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2009; Jivad y Rabiei, 2014; Park *et al.*, 2016; Sasikumar *et al.*, 2022). La neurogénesis puede corregir las funciones neuronales dañadas, pero es un procedimiento complejo que involucra múltiples redes de señalización que aún no se comprenden por completo. Por lo tanto, no

existen medicamentos aprobados por la FDA para inducir la neurogénesis en adultos (Sasikumar *et al.*, 2022). Como ha sido descrito anteriormente la neurogénesis puede clasificarse en etapas que incluyen la proliferación, especificación del destino o maduración, migración, orientación axón/dendrita e integración sináptica (Kitabatake *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2013). La neurogénesis puede reemplazar las neuronas perdidas y, por lo tanto, puede combatir las enfermedades neurodegenerativas. Estos descubrimientos plantean la posibilidad del uso de extractos de hierbas para generar nuevas neuronas funcionales, lo que ofrece la esperanza de nuevas terapias para abordar los trastornos neurodegenerativos. Los extractos de plantas son terapias novedosas con menos efectos secundarios y son más económicas. Tienen el potencial de ser los medicamentos que se pueden usar para tratar enfermedades neurodegenerativas y también para mejorar la memoria (Sasikumar *et al.*, 2022). Por estas razones y por ser escasos los estudios que evalúen la tasa de neurogénesis en animales diabéticos que hayan sido tratados con extractos de plantas se decidió dentro de nuestro estudio determinar tanto la etapa de proliferación con el anticuerpo BrdU como la etapa de maduración con el anticuerpo de DCX dentro del GD, siendo un área neurogénica importante, en las ratas con los diferentes tratamientos.

Además existen diversos estudios donde se reporta una disminución de la proliferación y supervivencia celular dentro del hipocampo, específicamente de neuronas, en animales con DM (Kim *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2013; Hamilton *et al.*, 2011; Sasikumar *et al.*, 2022), donde la muerte neuronal del hipocampo es un factor importante en el progreso del deterioro de la memoria en muchos trastornos cerebrales (Ahn *et al.*, 2015). Sin embargo, existen reportes de animales diabéticos de edad temprana donde se reporta que estos presentan un aumento de proliferación celular (BrdU⁺) respecto a sus animales control (Lang *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2013; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2014). Este comportamiento se puede presentar debido al método de inducción de la DM y edad de los animales, ya que los animales al tener una edad temprana su tasa de neurogénesis es alta, además de que el sistema detecta una disminución celular cerebral provocada por la DM, lo que provoca una respuesta a la muerte celular en el que el sistema trata de compensar dicha pérdida celular aumentando la síntesis de células cerebrales que subsecuentemente al pasar del tiempo decae por el aumento en la edad y gravedad de la enfermedad en los animales (Lang *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2011). Dentro de nuestra investigación muy probablemente no se hizo notorio dicho comportamiento debido a que no se realizó inmunotinción de BrdU y DCX en diferentes tiempos con diferentes ratas, sino únicamente se evaluó al finalizar dicho ensayo, encontrando una clara disminución tanto de precursores neurales como de neuronas inmaduras

en las ratas diabéticas sin tratamiento respecto al tratamiento control (Fig 30A y Fig. 31A). Es importante destacar que la supervivencia y diferenciación de estas células se ven afectadas por su microambiente, incluyendo factores de crecimiento y factores neurotróficos que aumentan la proliferación, diferenciación y supervivencia, los cuales son alterados por la DM (Zhang *et al.*, 2020; Di Meo *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022), por lo que si la diabetes no se trata, es difícil que la proliferación celular aumente y es poco probable que las células recién generadas sobrevivan y se diferencien en neuronas completamente funcionales (Hamilton *et al.*, 2011), como hemos demostrado en este estudio donde las ratas diabéticas sin tratamiento tuvieron un decremento tanto en las células BrdU⁺ como DCX⁺, en cambio las ratas tratadas con el EASC tuvieron un incremento de ambos marcadores, llegando a no presentar diferencia con el grupo control sano, lo que nos indica que el EASC brinda tanto protección a la proliferación por el aumento de células recién generadas, como a la supervivencia celular por permitir que las células recién generadas maduren para convertirse en neuronas, y en general un aumento de la neurogénesis. En cambio las ratas tratadas con MF mostraron un pequeño aumento en ambos marcadores respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento sin llegar a ser este significativo en ambos casos y por lo tanto el tratamiento con MF tampoco aumentó dichos marcadores a un nivel normal, al no llegar a una diferencia no significativa con el grupo control. Además, las ratas tratadas con MF presentaron un decremento sin llegar a ser significativo en el número de células BrdU⁺ respecto al grupo tratado con el EASC, sin embargo, tal decremento llegó a ser significativo en el número de células DCX⁺, interpretándose que el tratamiento con MF en las ratas diabéticas puede ser parcialmente benéfico para la proliferación celular cerebral pero no para la supervivencia neuronal, por lo menos en la zona del GD. Lo que también nos indica que el tratamiento con el extracto puede traer mejores resultados de neuroprotección que el tratamiento con MF (Figuras 30 y 31).

Dentro de la literatura es prácticamente nulo encontrar estudios donde se evalué la capacidad de neuroprotección y aumento de neurogénesis en el GD con extractos de plantas en animales diabéticos. Los únicos estudios que se encontraron fueron los realizados por Shin y colaboradores en 2008 y por Kim y colaboradores en 2003 quienes utilizaron el extracto acuoso de la planta de *Anemarrhena rhizome* y *Folium mori* respectivamente con considerables concentraciones de polifenoles (Cai *et al.*, 2016; Piwowar *et al.*, 2020) para administrarlo a animales diabéticos, donde al igual que en nuestros resultados al administrarles el extracto a las ratas diabéticas éstas aumentaron el número de BrdU⁺ llegando a no presentar diferencias significativas con su respectivo grupo de ratas control. Lo que nos hace pensar que el utilizar este tipo de plantas o bien sus extractos para tratar las complicaciones presentadas por la DM

tiene un gran potencial. Dentro de estos estudios no realizaron inmunotinciones con DCX, ni tampoco se encontró ningún estudio con animales diabéticos administrados con extractos donde se utilizará DCX u otro marcador para evaluar la neurogénesis, por lo que no es posible comparar estos resultados. Por tal motivo los resultados presentados con DCX⁺ en este proyecto, hacen de este un proyecto innovador, además de ser posiblemente el primer reporte donde se describen estos resultados en ratas diabéticas tratadas con un extracto. Sin embargo, existen estudios donde evalúan el aumento de neurogénesis y neuroprotección, así como el mejoramiento de la cognición, memoria y aprendizaje con extractos de plantas en animales sanos y con enfermedades cerebrales como la EA fuertemente relacionada con la DM, donde incluso los animales sanos administrados con dichos extractos o con polifenoles puros logran superar los puntajes de las pruebas conductuales realizadas y el número de células BrdU⁺ y DCX⁺ respecto a los animales sanos que no recibieron ningún tratamiento (Adams *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2011; Jivad y Rabiei, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2016; Sasikumar *et al.*, 2022; Castañeda *et al.*, 2022; Lee (b) *et al.*, 2023).

Estos estudios sugieren que la neurogénesis del hipocampo puede ser afectada por productos naturales y componentes en hierbas medicinales (aún en ausencia de alguna enfermedad), la gran mayoría con altas concentraciones de polifenoles (Infante y Garcia *et al.* 2019) por lo que muy posiblemente presentan dicho efecto y otros más. La mayoría de los estudios sobre compuestos y extractos naturales se han centrado en sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias. Sin embargo, la neurodegeneración es un proceso patogénico multifactorial y es factible que varios mecanismos subyacentes concomitantes sean los responsables de su efecto neuroprotector final. En este sentido, los polifenoles son capaces de modular la actividad de múltiples dianas implicadas, a las que aportan sus efectos pleiotrópicos (antiinflamatorios, antioxidantes o inmunomoduladores) y de hecho, los compuestos fenólicos han demostrado su papel neuroprotector *in vitro*, en modelos animales y en estudios clínicos (Kean *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2019). De acuerdo con estas observaciones, los polifenoles no solo están implicados en la eliminación de radicales libres y la reducción del estrés oxidativo, sino que también pueden modular las cascadas de señalización cerebral implicadas en la apoptosis neuronal, alterar la expresión de genes específicos y modificar la actividad mitocondrial (Infante y Garcia *et al.* 2019). Tal como es reportado por diferentes estudios, incluso algunos mencionados anteriormente dentro de esta discusión, donde se ve aumentada la expresión de diferentes factores y vías neurotróficas por la presencia de los polifenoles en los extractos de las plantas. Dentro de las muchas moléculas neurotróficas que han sido analizadas y se ha observado que aumentan su expresión en los animales administrados con extractos de

plantas y disminuidas en los animales diabéticos se encuentran MAPK, TrkB, BDNF, CREB y el factor transcripcional relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), así como el aumento de moléculas antiapoptóticas y antiinflamatorias en los animales tratados. Ya que los niveles de BDNF en el hipocampo están relacionados con la neurogénesis del hipocampo y la plasticidad sináptica, y la expresión de BDNF está mediada por el factor de transcripción CREB. Donde además BDNF ha sido reportado que interviene en la regulación de la ingesta de alimento y el peso corporal tanto en animales de experimentación como en humanos (Bathina y Das, 2015), donde esto puede explicar parcialmente también el aumento de peso en los animales administrados con el EASC. Por lo que sería interesante investigar la participación de la señalización de BDNF-CREB en la mejora de la neurogénesis causada por los extractos. Donde los estudios realizados por Bhutada *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2016, Patro *et al.*, 2016, Patel *et al.*, 2018, Moulton *et al.*, 2015, Ahmed *et al.*, 2019, Pang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022, Lee (b) *et al.*, 2023, mejoraron la neurogénesis, la memoria cognitiva y aprendizaje al elevar la señalización de BDNF-CREB, la plasticidad sináptica, moléculas antiapoptóticas y antiinflamatorias y otros factores neurotróficos al administrar extractos de plantas o polifenoles aislados. Además, se encontró que en los animales que tenían bajas concentraciones de estas moléculas sufrían mayor depresión y disminuciones en distintas funciones llevadas a cabo por el hipocampo.

Como indican nuestros resultados, los animales a los que se les administró el EASC mostraron mejores resultados en las pruebas conductuales realizadas, así como mayor número de células marcadas para BrdU⁺ y DCX⁺ lo que nos indica que efectivamente el EASC tiene un efecto neuroprotector, además de un efecto considerable sobre el estado emocional, la memoria, cognición y aprendizaje, atribuible muy probablemente a la presencia de polifenoles, ya que existe mucha información, como se ha mencionado, de como los polifenoles pueden realizar efectos benéficos en el cerebro, donde dichos beneficios son provocados en gran parte gracias al aumento de expresión y actividad de diferentes factores neurotróficos como los mencionados anteriormente también, donde al factor que más se le atribuye tal efecto es a BDNF, que ha sido demostrado que un aumento de este mejora la cognición, tanto en animales como en humanos (Zhen *et al.*, 2013; Murillo-Ortíz *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Rozanska *et al.*, 2020). Además de sus efectos centrales sobre el tejido cerebral, el BDNF tiene un papel en la homeostasis energética en humanos, por lo tanto, la cantidad de datos sobre el papel del BDNF en el control metabólico, especialmente el metabolismo y reducción de la glucosa y la resistencia a la insulina en diferentes órganos, sigue aumentando (Rozanska *et al.*, 2020; Meek *et al.*, 2013). Y dado que este BDNF

es producido principalmente por el SNC, pero también por los tejidos periféricos donde tiene, efectos sobre el metabolismo de la glucosa, se predice que tiene efectos en otros órganos, a parte del cerebro los cuales se ven potenciados igualmente en presencia del EASC rico en polifenoles, mejorando aún más el metabolismo de la glucosa y disminuyendo así los efectos y complicaciones de la DM2 (Bathina y Das., 2015; Rozanska *et al.*, 2020), tal como aumentar la supervivencia de las células β por el aumento de CREB y CBP, y también mejorar la regulación de la ingesta de alimentos y peso corporal (Bathina y Das., 2015). Otros estudios realizados en roedores encontraron que al administrar metformina, también existía un aumento en el puntaje de pruebas conductuales y la expresión de BDNF y CREB en los animales respecto a grupos con hiperglucemia, lo que quedaría parcialmente a prueba, debido a que las ratas tratadas con MF dentro de nuestro ensayo tuvieron buenos resultados hipoglucémicos pero no se mostraron tan buenos resultados en las inmunotinciones y pruebas conductuales (Pintana *et al.*, 2012; Śmieszek *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2021; Sritawan *et al.*, 2023). Así mismo, otros estudios informaron que el agonista de PPAR γ , rosiglitazona, mejora el rendimiento cognitivo tanto en humanos como en animales (O'Reilly y Lynch 2012; Pipatpiboon *et al.*, 2012). Donde es de destacar que tal efecto por los fármacos antidiabéticos puede ser brindado ya que los animales se encontraban solo hiperglucémicos pero no fue inducida la DM como tal.

El estudio de compuestos puros se limita a sus mecanismos moleculares en modelos celulares de neurodegeneración y sus efectos biológicos específicos en modelos animales. Por otro lado, los estudios que utilizan polifenoles puros pasan por alto las sinergias entre diferentes polifenoles, la microbiota y la interacción con otras moléculas. Por lo que se cree y ha sido demostrado en algunos estudios que se pueden tener mejores resultados al utilizar el extracto de una planta a utilizar sus compuestos de forma aislada. La presencia de sinergismo y profármacos en un extracto puede ser engañosa si se utilizan compuestos puros (Verpoorte *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Figueira *et al.*, 2017; Renaud y Martinoli, 2019). Por lo tanto, los estudios con fracciones enriquecidas con polifenoles pueden ser útiles no solo para identificar fuentes para aislar compuestos bioactivos puros, sino también para identificar mezclas de compuestos bioactivos. Dado que los polifenoles son compuestos clave emergentes para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para las ND, la identificación de dianas moleculares de polifenoles aislados o la identificación de nuevas fuentes de polifenoles neuroactivos se ha convertido en un área importante de investigación. Además nuestro extracto al presentar tan buenos resultados nos indica que tiene un buen método de preparación, biodisponibilidad, absorción, transportación, sinergia, captación

celular y cerebral, así como al no presentar ninguna complicación en los animales durante el ensayo se cree que no tiene toxicidad y por lo tanto es segura y tolerable, siendo muy posible en algún futuro poder ser recomendado su uso en humanos, aunque faltaría realizar estudios específicos para dilucidar todas estas características.

Al relacionar todos los resultados obtenidos se puede entender que los parámetros metabólicos, como el peso corporal, la concentración de glucosa, HbA1c e insulina, son buenos predictores de muchas alteraciones en la DM como las afectaciones cognitivas, emocionales, en la memoria y aprendizaje, así como en la neurogénesis y supervivencia neuronal, tal como es mencionado en algunos otros estudios (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2013; 2014; Jivad y Rabiei, 2014). Donde a mayor alteración en los parámetros metabólicos existan, peores puntajes en las pruebas conductuales y menor número de marcadores celulares en los animales diabéticos existirán y viceversa. Por lo que la reducción en el número de células en proliferación, supervivencia y diferenciación neuronal dentro del GD se asocia con los déficits cognitivos inducidos por el deterioro de la capacidad de aprendizaje y memoria (espacial y no espacial) en la diabetes. Se ha sugerido que existe una estrecha relación entre el número de nuevas neuronas y el rendimiento de las tareas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo (Shors *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2008; Leuner *et al.*, 2012).

Durante el estudio se decidió inyectar a las ratas 3 días antes con el BrdU para evaluar la proliferación celular, aunque si bien la inmunotinción con este marcador nos da información de las células que se están generando, esto también nos puede brindar información de la supervivencia celular de por al menos 3 días de todos los tratamientos, ya que la administración de ellos continuó de forma crónica, donde algunos otros estudios han utilizado el mismo régimen de administración de BrdU para evaluar dicha supervivencia (Park *et al.*, 2016).

X. CONCLUSIONES

La administración crónica del extracto acuoso de las hojas de *Spathodea campanulata* ejerce un efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes mellitus tipo 2. La administración del extracto también normaliza el peso corporal de las ratas. Además, la administración crónica del extracto en las ratas diabéticas inhibe el deterioro cognitivo provocado por la diabetes, mejorando la conducta similar a la ansiedad, la memoria y aprendizaje (espacial y no espacial), retrasando por lo tanto las afectaciones presentadas en el hipocampo por la enfermedad, así como dicha administración también disminuye las reducciones cerebrales y el daño celular en las neuronas provocadas por la enfermedad e incrementa la tasa de neurogénesis en el giro dentado de las ratas diabéticas, sustentando de esta forma un efecto neuroprotector.

La administración crónica de metformina tiene un efecto hipoglucemiante en las ratas con diabetes mellitus 2, así como efectos sobre la conducta similar a la ansiedad, la memoria y aprendizaje, y en las reducciones cerebrales pero no tiene efectos considerables en la tasa de neurogénesis en el giro dentado. Por lo que el tratamiento con el extracto de hojas de *Spathodea campanulata* es más eficiente que el tratamiento con metformina para un efecto neuroprotector y para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones en ratas.

XI. PERSPECTIVAS

- Realizar la administración crónica conjunta del extracto y metformina en ratas con DM2 y evaluar su efecto en la cognición, efecto neuroprotector, farmacodinámico y farmacocinético.
- Formar grupos de estudio equiparables para realizar un transcriptoma que permita evaluar la expresión total de genes de interés como receptores de insulina, transportadores de entrada y metabolismo de glucosa, antioxidantes, moléculas pro/anti inflamatorias, proteínas estimuladoras de mitogénesis, receptores y moléculas de las vías de daño tisular (vía sorbitol, AGE's, PKC, etc.), proteínas, receptores y factores que intervienen en vías neurotróficas e identificar la relación de la expresión de estos con los resultados expuestos en este proyecto.
- Con modelos de animales similares evaluar el grosor y adelgazamiento hipocampal.
- Realizar una colocalización de neuronas mediante inmunohistoquímica con marcadores BrdU y DCX para evaluar diferenciación y supervivencia neuronal en ratas diabéticas tratadas con el extracto.
- Evaluar la tasa de neurogénesis en ratas sanas administradas con el EASC.
- Identificar la presencia, tipificación, composición y papel de la microbiota intestinal de los animales administrados con el extracto en el metabolismo, absorción y transporte de polifenoles, y relacionarlo a la alteración de vías neurotróficas, efectos neuroprotectores y metabolismo de la glucosa.

XII. REFERENCIAS

- Adams M., Gmünder F. and Hamburger M. 2007. Plants traditionally used in age related brain disorders--a survey of ethnobotanical literature. *Journal Ethnopharmacology*. 113 (3): 363-81. DOI: [10.1016/j.jep.2007.07.016](https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.016)
- Agrawal R., Tyagi E., Shukla R. and Nath C. 2011. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *European Neuropsychopharmacology*. 21 (3): 261-73. DOI: [10.1016/j.euroneuro.2010.11.009](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.11.009)
- Ahmadpour S., Sadeghi Y., Sheibanifar M. and Haghiri H. 2010. Neuronal death in dentate gyrus and ca3 in diabetic rats: Effects of insulin and ascorbic acid. *Hormozan Journal Medical Sciences*. 13: 13-6. DOI: [10.4103/2008-7802.178531](https://doi.org/10.4103/2008-7802.178531)
- Ahmed A. J., Majeed S. R., and Obaid H. M. 2020. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 11(11): 850-860.
- Ahmed A., Zeng G., Jiang D., Lin H., Azhar M., Farooq A. D., Choudhary M. I., Liu X. and Wang Q. 2019. Time-dependent impairments in learning and memory in Streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Metabolic Brain Disease*. 34 (5): 1431-1446. DOI: [10.1007/s11011-019-00448-7](https://doi.org/10.1007/s11011-019-00448-7)
- Ahn S. M., Kim Y. R., Kim H. N., Choi Y. W., Lee J. W., Kim C. M., Baek J. U., Shin H. K. and Choi B. T. 2015. Neuroprotection and spatial memory enhancement of four herbal mixture extract in HT22 hippocampal cells and a mouse model of focal cerebral ischemia. *BMC Complementary Alternative Medical*. 15: 202. DOI: [10.1186/s12906-015-0741-1](https://doi.org/10.1186/s12906-015-0741-1)
- Aksu I., Ates M., Baykara B., Kiray M., Sisman A. R., Buyuk E., Baykara B., Cetinkaya C., Gumus H. and Uysal N. 2012. Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. *Neuroscience Letters*. 531 (2): 176-81. DOI: [10.1016/j.neulet.2012.10.045](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.10.045)
- Al Disi S. S., Anwar M. A. and Eid A. H. 2016. Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: part I. *Frontiers in Pharmacology*. 6: 323-337. DOI: [10.3389/fphar.2015.00323](https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00323)
- Alam S., Sarker M., Sultana T., Chowdhury M. N., Rashid M. A., Chaity N. I., Zhao C., Xiao J., Hafez E. E., Khan S. A. and Mohamed I. N. 2022. Antidiabetic Phytochemicals From Medicinal Plants: Prospective Candidates for New Drug Discovery and Development. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 24 (13). DOI: [10.3389/fendo.2022.800714](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.800714)
- Alarcón N. R. H. 2014. Efecto insecticida, repelente y fungistático de extractos de hojas y flores de “llama del bosque” (*Spathodea campanulata* beauv)”. Tesis doctoral. Doctorado en ciencias naturales para el desarrollo. Énfasis en sistemas de producción agrícolas. Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia, Costa Rica.
- Aldebasi Y, El-Gendy S. M, Kamel A. and Mohieldein A. 2013. Aldo-keto reductase and sorbitol dehydrogenase enzymes in Egyptian diabetic patients with and without proliferative diabetic retinopathy. *Clinical and Experimental Optometry*. 96: 303-309. DOI: [10.1111/cxo.12014](https://doi.org/10.1111/cxo.12014)
- Alejandro E. U., Mamerto T. P., Chung G., Villavieja A., Gaus N. L., Morgan E., Pineda-Cortel M. R. B. 2020. Gestational Diabetes Mellitus: A Harbinger of the Vicious Cycle of Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(14): 5003-5017. DOI: [10.3390/ijms21145003](https://doi.org/10.3390/ijms21145003)
- Al-Enazi M. M. 2014. Protective effects of combined therapy of Rutin with Silymarin on experimentally-induced diabetic neuropathy in rats. *Pharmacology Pharmacy*. 5(9): 876-888. DOI: [10.4236/pp.2014.59098](https://doi.org/10.4236/pp.2014.59098)
- Amusan O. G., Adesogan E. K. and Makinde J. M. 1996. Antimalarial active principles of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytotherapy Research, London*. 10 (8): 692-693. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.51139>
- Amusan O. G., Msonthi J. D. and Makhubu L. P. 1995. Molluscicidal activity of *Spathodea campanulata*, *Andrachne ovalis*, *Phytolacca dodecandra* and *Hypoxis rooperi*. *Fitoterapy, Amsterdam*. 66 (3): 113-116.
- Andrade C., Gomes N. G. M., Duangsrissai S., Andrade P. B., Pereira D. M. and Valentão P. 2020. Medicinal plants utilized in Thai Traditional Medicine for diabetes treatment: ethnobotanical surveys, scientific evidence and phytochemicals. *Journal of ethnopharmacology*. 263: 113177. DOI: [10.1016/j.jep.2020.113177](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113177)

- Antunes M. and Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognition Processive*. 13 (2): 93-110. DOI: [0.1007/s10339-011-0430-z](https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z)
- Bachhav R. and Saudagar R. 2018. Effect of ethanolic flower extract of *Spathodea cammulata* on streptozotocin induced diabetic neuropathy. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 10 (5): 64-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2018v10i5.21968>
- Bahramsoltani R., Farzaei M. H., Ram M., Nikfar S. and Rahimi R. 2021. Bioactive Foods and Medicinal Plants for Cardiovascular Complications of Type II Diabetes: Current Clinical Evidence and Future Perspectives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. DOI: [10.1155/2021/6681540](https://doi.org/10.1155/2021/6681540)
- Bai L., Gao J., Wei F., Zhao J., Wang D. and Wei J. 2018. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes. *Frontiers Pharmacology*. 9: 423-433. DOI: [10.3389/fphar.2018.00423](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00423)
- Bailey S. A., Zidell R. H. and Perry R. W. 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. *Toxicologic pathology*. 32 (4): 448-466. DOI: [10.1080/01926230490465874](https://doi.org/10.1080/01926230490465874)
- Balu D. T. and Lucki, I. 2009. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 33(3): 232-252. DOI: [10.1016/j.neubiorev.2008.08.007](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.08.007)
- Bari A., Shah S.M.M., Al-Joufi F.A., Shah S.W.A., Shoaib M., Shah I., Zahoor M., Ahmed M.N., Ghias M., Shah S.M.H. and Khalil A.A.K. 2022. Effects of *Artemisia macrocephala* Jacquem on Memory Deficits and Brain Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Molecules*. 8; 27 (8): 2399.
- Bathina S. and Das U. N. 2015. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archived Medical Science*. 11 (6): 1164-1178. DOI: [10.5114/aoms.2015.56342](https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342)
- Baz B., Riveline J. P. and Gautier J. F. 2016. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *European Journal Endocrinology*. 174(2): R43-51. DOI: [10.1530/EJE-15-0378](https://doi.org/10.1530/EJE-15-0378)
- Berge L. I. and Riise T. 2015. Comorbidity between Type 2 Diabetes and Depression in the Adult Population: Directions of the Association and Its Possible Pathophysiological Mechanisms. *International Journal Endocrinology*. 2015: 164760. DOI: [10.1155/2015/164760](https://doi.org/10.1155/2015/164760)
- Beyer Jr, W. F. and Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*. 161(2): 559-566. DOI: [10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Bhutada P., Mundhada Y., Bansod K., Bhutada C., Tawari S., Dixit P., and Mundhada D. 2010. Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurobiology of Learning and Memory*. 94 (3): 293–302.
- Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. (BNMEUA). 2013 Diabetes tipo 2. Consultado en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000313.htm> el 21/06/2021.
- Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. (BNMEUA). 2013. Diabetes tipo 1. Consultado en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000305.htm> el 18/06/2021.
- Biessels G. J. and Reijmer Y. D. 2014. Brain changes underlying cognitive dysfunction in diabetes: what can we learn from MRI?. *Diabetes*. 63 (7): 2244-2252. DOI: [10.2337/db14-0348](https://doi.org/10.2337/db14-0348)
- Binder D.K. and Scharfman H.E. 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 22 (3): 123-131. DOI: [10.1080/08977190410001723308](https://doi.org/10.1080/08977190410001723308)
- Blázquez E., Velázquez E., Hurtado-Carneiro V. and Ruiz-Albusac J. M. 2014. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5:161. DOI: [10.3389/fendo.2014.00161](https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161)
- Bonola I. F., Irigoyen M. E., Vera L. I., Campero A. and Hamdan A. 2014. Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias clínicas*. 15 (1): 2-8. DOI: [10.1016/j.cc.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.cc.2015.06.002)

- Bornstein N. M., Brainin M., Guekht, A. 2014. Diabetes and the brain: issues and unmet needs. *Neurol Science*. 35: 995–1001. DOI: [10.1007/s10072-014-1797-2](https://doi.org/10.1007/s10072-014-1797-2)
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72 (1-2): 248-254. DOI: [10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999)
- Brown J. P, Couillard-Després S., Cooper-Kuhn C. M., Winkler J., Aigner L. and Kuhn H. G. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467 (1): 1-10. DOI: [10.1002/cne.10874](https://doi.org/10.1002/cne.10874)
- Butterfield D. A., Di Domenico F., Barone E. 2014. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochim Biophys Acta.* 1842: 1693-1706. DOI: [10.1016/j.bbadis.2014.06.010](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.010)
- Cai S., Sun W., Fan Y., Guo X., Xu G., Xu T., Hou Y., Zhao B., Feng X. and Liu T. 2016. Effect of mulberry leaf (Folium Mori) on insulin resistance via IRS-1/PI3K/Glut-4 signalling pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *Pharmacology Biology*. 54 (11): 2685-2691. DOI: [10.1080/13880209.2016.1178779](https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1178779)
- Calderón-Salinas J. V., Muñoz-Reyes E. G. y Quintanar-Escorza M. A. 2013. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB Revista de Educación Bioquímica*. 32(2): 53-66.
- Camacho-Ugarte V., Bastida C. A. y Zarate S. G. 2020. Estudio anatómico del hipocampo como una de las regiones de neurogénesis más relevante. *Revista Científica Ciencia Médica*. 23(2): 221-230.
- Campbell J., E. and Newgard C., B. 2021. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 22(2): 142–158. DOI: [10.1038/s41580-020-00317-7](https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7)
- Can Ö. D., Üçel U. I., Demir Ö. Ü., and Ulupinar E. 2018. The effect of agomelatine treatment on diabetes-induced cognitive impairments in rats: concomitant alterations in the hippocampal neuron numbers. *International journal of molecular sciences*. 19(8): 2461-2475. <https://doi.org/10.3390/ijms19082461>
- Castañeda R., Cáceres A., Velásquez D., Rodríguez C., Morales D, and Castillo A. 2022. Medicinal plants used in traditional Mayan medicine for the treatment of central nervous system disorders: An overview. *Journal Ethnopharmacology*. 283: 114746. DOI: [10.1016/j.jep.2021.114746](https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114746)
- Castro M.V.M. 2015. Determinación de la actividad hipoglicemiante de las hojas de *Rubusurticifolius*Poir. (Mora silvestre) y las hojas de *Rubusrosaefolius*Sm. (Frambuesa silvestre) en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Tesis de maestría. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cersosimo E., Curtis T., Solis-Herrera C., Lawrence J. M. and De Fronzo R. 2018. Diabetic Neuropathies. Editores; Feingold K. R., Anawalt B. y Boyce A. Endotexto. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/> el 24/06/2021.
- Cervantes-Villagrana R. D. y Presno-Bernal J. M. 2013. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Revista mexicana de Endocrinología y Nutrición*. 21 (3): 98-106.
- Chan E.W.L., Yeo E.T.Y., Wong K.W.L., See M.L., Wong K.Y. and Gan S.Y. 2019. Piper sarmentosum Roxb. Root Extracts Confer Neuroprotection by Attenuating Beta Amyloid-Induced Pro-Inflammatory Cytokines Released from Microglial Cells. *Current Alzheimer Res*. 16: 251–260. Doi: 10.2174/1567205016666190228124630.
- Chance B. and Maehly A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 2 (1): 763-775. DOI: [10.1002/9780470110171.ch14](https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14)
- Charnogursky G. 2014. Neurological complications of diabetes. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 14 (3): 457-471. DOI: [10.1007/s11910-014-0457-5](https://doi.org/10.1007/s11910-014-0457-5)
- Chaudhury A., Duvoor C., Dendi V.S., Kraleti S., Chada A. and Ravilla R. 2017. Clinical review of antidiabetic drgs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in Pharmacology*. 8 (3): 1-12. DOI: [10.3389/fendo.2017.00006](https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00006)

- Chen L., Fei S. and Olatunji O. J. 2022. LC/ESI/TOF-MS Characterization, Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of *Mitragyna speciosa* Korth Extract in Diabetic Rats. *Molecules*. 27 (7): 2208. DOI: [10.3390/molecules27072208](https://doi.org/10.3390/molecules27072208)
- Cheng J. T., Huang C. C., Liu I. M., Tzeng T. F. and Chang C. J. 2006. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 55(3): 819-825. DOI: [10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0934](https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0934)
- Choi J. H, Hwang I. K., Yi S. S., Yoo K. S., Lee C. H. and Shin H. C. 2009 Effects of streptozotocin-induced type 1 diabetes on cell proliferation and neuronal differentiation in the dentate gyrus; correlation with memory impairment. *Korean Journal Anatomy*. 42: 41–8. DOI: [G704-000177.2009.42.1.007](https://doi.org/G704-000177.2009.42.1.007)
- Chukwuma C. I., Matsabisa M. G., Ibrahim M. A., Erukainure O. L., Chabalala M. H. and Islam M. S. 2019. Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 235: 329-360. DOI: [10.1016/j.jep.2019.02.024](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.024)
- Cintra P., Malaspina O. y Bueno O. P. 2005. Plantas tóxicas para abelhas. *Arquivos do Instituto Biológico*. 72: 547-551.
- Cohen S. J. and Stackman R. W., Jr. 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural brain research*. 285: 105–117. DOI: [10.1016/j.bbr.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002)
- Cole J. B. and Florez J. C. 2020. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews nephrology*. 16(7): 377-390. DOI: [10.1038/s41581-020-0278-5](https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5)
- Cosentino-Gomes D., Rocco-Machado N. and Meyer-Fernandes J. R. 2012. Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *International Journal Molecular Science*. 13: 10697-10721. DOI: [10.3390/ijms130910697](https://doi.org/10.3390/ijms130910697)
- Couillard-Despres S., Winner B., Schaubeck S., Aigner R., Vroemen M., Weidner N., Bogdahn U., Winkler J, Kuhn H. G. and Aigner L. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci*. 21 (1): 1-14. DOI: [10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x)
- Csajbók É.A. and Tamás G. 2016. Cerebral cortex: a target and source of insulin?. *Diabetology*. 59: 1609–1615. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3996-2>
- Cuadro E. 2018. *Spathodea campanulata* (Tulipán africano). Diversidad Biológica 1. Consultado en: <https://diversidadbiologica1upn.wordpress.com/2018/05/04/spathodea-campanulata-tulipan-africano-por-elvia-cuadrado/> el 17/06/2021.
- Das J., Ramani R. and Suraju M. O. 2016. Polyphenol compounds and PKC signaling, *Biochem. Biophys. Acta* 1860 (10): 2107–2121. Wu M. Y., Yiang G. T., Lai T. T. and Li C. J. 2018. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Oxid Medical Cell Longev*. 5: 3420187. DOI: [10.1016/j.bbagen.2016.06.022](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.022)
- Delbosc S., Paizanis E., Magous R., Araiz C., Dimo T., Cristol J. P., Cros G. and 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. DOI: [10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.018](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.018)
- Demir C.F., Balduz M., Taşçı İ. and Kuloğlu T. 2021. Protective effect of pregabalin on the brain tissue of diabetic rats. *Diabetology International*. 12 (2): 207-216. DOI: [10.1007/s13340-020-00476-0](https://doi.org/10.1007/s13340-020-00476-0)
- den Heijer T., Vermeer S. E. and van Dijk E. J. 2003. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia*. 46: 1604–1610. DOI: [10.1007/s00125-003-1235-0](https://doi.org/10.1007/s00125-003-1235-0)
- Descalzo C. y Velasco A.J. 2017. Manual para pacientes con diabetes tipo 2. Ed. Mc Graw Hill. México pp. 13-23.
- Di Meo F., Valentino A., Petillo O., Peluso G., Filosa S. and Crispi S. 2020. Bioactive polyphenols and neuromodulation: Molecular mechanisms in neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*. 21(7): 2564. DOI: [10.3390/ijms21072564](https://doi.org/10.3390/ijms21072564)
- Diabetes Teaching Center at the University of California, San Francisco (UCSF). Diabetes Education Online. Consultado en <https://dtc.ucsf.edu/es/la-vida-con-diabetes/complicaciones/cetoacidosis-diabetica/> el 02/12/2022.

- Diabetes U. K. 2010. Key statistics on diabetes. *Diabetes in the UK*. Consultado en https://www.diabetes.org.uk/resources-s3/2017-11/diabetes_in_the_uk_2010.pdf el 18/06/2021.
- Díaz N L. y Delgado A. E. 2016. Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes. Medicina, Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 12 (17): 935–946.
- Duan W., Zhang Y.-P., Hou Z., Huang C., Zhu H., Zhang C.-Q., and Yin Q. 2015. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Molecular Neurobiology*. 53(3): 1637–1647. DOI: [10.1007/s12035-015-9122-5](https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5)
- Dueñas M., Cueva C., and Muñoz-González I. 2015. Studies on modulation of gut microbiota by wine polyphenols: from isolated cultures to omic approaches. *Antioxidants*. 4: 1-21. DOI: [10.3390/antiox4010001](https://doi.org/10.3390/antiox4010001)
- Dupas J., Goanvec C., Feray A., Guernec A., Alain C., Guerrero F., and 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): e0146821. DOI: [10.1371/journal.pone.0146821](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146821)
- Ekor M. 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*. 4: 177-186. DOI: [10.3389/ffar.2013.00177](https://doi.org/10.3389/ffar.2013.00177)
- EL-HELA A. A. 2001. Phenolics from *Spathodea campanulata* Beauv. leaves. Al-Azhar. *Journal of Pharmaceutical Sciences, Cairo*. 27 (3): 152-162.
- Epp J. R., Spritzer M. D. and Galea L. A. 2007. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*. 149 (2): 273-85. DOI: [10.1016/j.neurociencia.2007.07.046](https://doi.org/10.1016/j.neurociencia.2007.07.046)
- Erus G., Battapady H., Zhang T., Lovato J., Miller M. E., Williamson J. D., Launer L. J., Bryan R. N. and Davatzikos C. 2015. Spatial patterns of structural brain changes in type 2 diabetic patients and their longitudinal progression with intensive control of blood glucose. *Diabetes care*. 38(1): 97-104. DOI: [10.2337/dc14-1196](https://doi.org/10.2337/dc14-1196)
- Escamilla B. M. S. 2019. Evaluación del efecto hipoglucemiante y neuroprotector de la administración oral de *Spathodea campanulata* en ratas diabéticas. Tesis de Maestría. Posgrado en ciencias de la salud, facultad de medicina de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México.
- Escobar-Gutiérrez A. 1995. Photosynthèse, partition du carbone et métabolisme du sorbitol dans les feuilles adultes de pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch) (Doctoral dissertation, Poitiers).
- Espeland M. A., Bryan R. N., Goveas J. S., Robinson J. G., Siddiqui M. S., Liu S., Hogan P. E., Casanova R., Coker L. H., Yaffe K., Masaki K., Rossom R., Resnick S. M. and WHIMS-MRI Study Group. 2013. Influence of type 2 diabetes on brain volumes and changes in brain volumes: results from the Women's Health Initiative Magnetic Resonance Imaging studies. *Diabetes Care*. 36 (1): 90-7. DOI: [10.2337/dc12-0555](https://doi.org/10.2337/dc12-0555)
- Estrada-Reyes R., Ubaldo-Suárez D. y Araujo-Escalona A. G. 2012. Los flavonoides y el sistema nervioso central. *Salud mental*. 35(5): 375-384
- Evcimen N. D., and King, G. L. 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological research*. 55(6): 498-510. DOI: [10.1016/j.phrs.2007.04.016](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.04.016)
- Farajpour R., Sadigh-Eteghad S., Ahmadian N., Farzipour M., Mahmoudi J. and Majdi A. 2017. Chronic Administration of *Rosa canina* Hydro-Alcoholic Extract Attenuates Depressive-Like Behavior and Recognition Memory Impairment in Diabetic Mice: A Possible Role of Oxidative Stress. *Medical Principles and Practice*. 26 (3): 245-250. DOI: [10.1159/000464364](https://doi.org/10.1159/000464364)
- Federación Internacional de Diabetes (FID). 2021. Atlas de la diabetes de la Federación Internacional de Diabetes. Consultado en: https://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2022/01/IDF_Atlas_10th_Edition_2021-comprimido.pdf el 07/05/2023.

- Ferris J. K., Inglis J. T., Madden K. M., and Boyd L. A. 2020. Brain and body: a review of central nervous system contributions to movement impairments in diabetes. *Diabetes*. 69(1): 3-11. DOI: [10.2337/db19-0321](https://doi.org/10.2337/db19-0321)
- Figueira I., Menezes R., Macedo D., Costa I., Dos Santos C. N. 2017. Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. *Current Neuropharmacology*. 15 (4): 562-594. DOI: [10.2174/1570159X14666161026151545](https://doi.org/10.2174/1570159X14666161026151545)
- Flach A. 2005. Ecología química de Maxillariinae, *Spathodea campanulata* e Meliponinae. Tesis Doctorado. Universidad Estatal de Campinas, Instituto de Química. São Paulo, Brasil.
- Foghi K. and Ahmadpour S. 2013. Diabetes mellitus type 1 and neuronal degeneration in ventral and dorsal hippocampus. *Iranian Journal of Pathology*: 9(1): 33-37.
- Fogwe A. L., Reddy V. and Mesfin B. F. 2021. Neuroanatomía, hipocampo. StatPearls [Internet]. Encontrado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482171/> el 30/09/2021.
- Forbes J. M and Cooper M. E. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Review*. 93(1): 137-188. DOI: [10.1152/physrev.00045.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011)
- Frade J. G., Ferreira N. R., Barbosa R. M. and Laranjinha J. 2005. Mechanisms of neuroprotection by polyphenols. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*. 5(4): 307-318. DOI: [10.2174/156801505774913062](https://doi.org/10.2174/156801505774913062)
- Franco D. P., Guerreiro J. C., Ruiz M. G. y Da Silva R. M. 2015. Evaluación del potencial insecticida del néctar de *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 41(1): 63-68.
- Franquez R. T., de Souza I. M. and Bergamaschi C. C. 2023. Interventions for depression and anxiety among people with diabetes mellitus: Review of systematic reviews. *PLoS One*. 18 (2):e0281376. DOI: [10.1371/journal.pone.0281376](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281376)
- Ge J. F., Xu Y. Y., Qin G., Cheng J. Q. and Chen F. H. 2016. Resveratrol ameliorates the anxiety-and depression-like behavior of subclinical hypothyroidism rat: possible involvement of the HPT axis, HPA axis, and Wnt/ β -catenin pathway. *Frontiers Endocrinology*. 7:44. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00044>
- Gerhard D. M., Wohleb E. S. and Duman R. S. 2016. Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov Today*. 21 (3): 454-464. DOI: [10.1016/j.drudis.2016.01.016](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.016)
- Ghiasi M. and Heravi M. M. 2011. Quantum mechanical study of antioxidative ability and antioxidative mechanism of rutin (vitamin P) in solution. *Carbohydrate Research*. 346(6): 739–744. DOI: [10.1016/j.carres.2011.01.021](https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.021)
- Ghibaudi M. and Bonfanti L. 2022. How Widespread Are the “Young” Neurons of the Mammalian Brain?. *Frontiers in Neuroscience*. 16: 918616. DOI: [10.3389/fnins.2022.918616](https://doi.org/10.3389/fnins.2022.918616)
- Ghorbani A. 2017. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 96: 305-312. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001)
- Golalipour M. J., Kafshgiri S. K. and Ghafari S. 2012. Gestational diabetes induced neuronal loss in CA1 and CA3 subfields of rat hippocampus in early postnatal life. *Folia Morphol (Warsz)*. 71 (2): 71-77. PMID: 22648583.
- Gold S.M., Dziobek I. and Sweat V. 2007. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 50: 711–719. DOI: [10.1007/s00125-007-0602-7](https://doi.org/10.1007/s00125-007-0602-7)
- Grimmig B., Kim S. H, Nash K., Bickford P. C., and Douglas R. S. 2017. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. *GeroScience*. 39(1):19-32. DOI: [10.1007/s11357-017-9958-x](https://doi.org/10.1007/s11357-017-9958-x)
- Gugliucci A. 2017. Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases. *Advances in nutrition*. 8(1): 54-62. DOI: [10.3945/an.116.013912](https://doi.org/10.3945/an.116.013912)
- Guía de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH). 2001. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Consultado en <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf> el 04/07/2021.

- Habig W. H., Pabst M. J., Fleischne, G., Gatmaitan Z., Arias I. M. and Jakoby W. B. 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 71 (10): 3879-3882. [10.1073/pnas.71.10.3879](https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3879)
- Hachkova H., Nagalievskia M., Soliljak Z., Kanyuka O., Kucharska A. Z., Sokół-Łętowska A. and Sybirna N. 2021. Medicinal Plants Galega officinalis L. and Yacon Leaves as Potential Sources of Antidiabetic Drugs. *Antioxidants*. 10(9): 1362-1372. DOI: [10.3390/antiox10091362](https://doi.org/10.3390/antiox10091362)
- Hamilton A., Patterson S., Porter D., Gault V. A. and Holscher C. 2011. New GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote disappearance of progenitor cells in the brain. *Journal Neuroscience Research*. 89 (4): 481-9. DOI: [10.1002/jnr.22565](https://doi.org/10.1002/jnr.22565)
- Hammond R. S., Tull L. E. and Stackman R. W. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology Learning and Memory*. 82 (1): 26-34. [10.1016/j.nlm.2004.03.005](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.03.005)
- Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., and Poutanen K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences*. 11(4): 1365-1402. DOI: [10.3390/ijms11041365](https://doi.org/10.3390/ijms11041365)
- Hashmi W. J., Ismail H., Mehmood F. and Mirza B. 2018. Neuroprotective, antidiabetic and antioxidant effect of *Hedera nepalensis* and lupeol against STZ + AlCl₃ induced rats model. *Daru*. 26 (2): 179-190. DOI: [10.1007/s40199-018-0223-3](https://doi.org/10.1007/s40199-018-0223-3)
- Havolli E., Hill M. D., Godley A. and Goetghebeur P. J. 2017. Spatial recognition test: A novel cognition task for assessing topographical memory in mice. *Journal of Psychopharmacology*. 31(6): 653-659. DOI: [10.1177/0269881117704987](https://doi.org/10.1177/0269881117704987)
- Heim S. C., Guarnier F. A., Ferreira D. T., Braz-Filho R., Cecchini R. y Cecchini, AL. 2012. Antioxidant activity of *Spathodea campanulata* (Bignoneaceae) extracts. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*. 14 (2): 287-292.
- Hernández V. M. L. 2019. Alteraciones de conducta y respuesta neuroinmune en células microgliales en ratas hembra adulta expuestas neonatalmente a un doble reto estrés-inmune. Tesis de licenciatura, UMICH. Michoacán, México.
- Hernández-Ávila M., Gutiérrez J. P., y Reynoso-Noverón N. 2013. Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud pública de México*. 55 (3): 129-136.
- Herrera A. A., Soca P. E. M., Será C. R., Soler A. L. M. y Guerra R. C. O. 2012. Actualización sobre diabetes mellitus. *Correo Científico Médico*. 16(2): 1-16.
- Herrera A. A., Soca P. E. M., Será C. R., Soler A. L. M. y Guerra R. C. O. 2012. Actualización sobre diabetes mellitus. *Correo Científico Médico*. 16(2): 1-16.
- Hesselink J. R. 2011. The temporal lobe and limbic system. *UCSD Neuroradiology*. 29.
- Ho N., Sommers M. S. and Lucki I. 2013. Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. *Neuroscience Biobehavior Revision*. 37 (8): 1346-62. DOI: [10.1016/j.neubiorev.2013.03.010](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.03.010)
- Hölscher C. 2011. Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*. 39 (4): 891-7. DOI: [10.1042/BST0390891](https://doi.org/10.1042/BST0390891)
- Horesh D., Sapir T., Francis F., Wolf S. G., Caspi M., Elbaum M., Chelly J. and Reiner O. 1999. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum. Mol. Genet*. 8 (9): 1599-610. DOI: [10.1093/hmg/8.9.1599](https://doi.org/10.1093/hmg/8.9.1599)
- Huang X., Liu G., Guo J. and Su Z. 2018. The pi3k/akt pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal Biology Science*. 14: 1483-1496. DOI: [10.7150/ijbs.27173](https://doi.org/10.7150/ijbs.27173)
- Hughes T. M., Ryan C. M. and Aizenstein H. J. 2013. Frontal gray matter atrophy in middle aged adults with type 1 diabetes is independent of cardiovascular risk factors and diabetes complications. *Journal Diabetes Complications*. 27: 558-564. DOI: [10.1016/j.jdiacomp.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.07.001)

- Illsley N. P. y Baumann M. U. 2020. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1866(2): 165359- 165372. DOI: [10.1016/j.bbadis.2018.12.010](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.010)
- Infante-Garcia C. and Garcia-Alloza M. 2019. Review of the Effect of Natural Compounds and Extracts on Neurodegeneration in Animal Models of Diabetes Mellitus. *International Journal Molecular Science*. 20 (10): 2533. DOI: [10.3390/ijms20102533](https://doi.org/10.3390/ijms20102533)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadística de defunciones registradas en el 2022. Consultado en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf> el 09/05/2023.
- Jivad N. and Rabiei Z. 2014. A review study on medicinal plants used in the treatment of learning and memory impairments. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(10): 780-789. DOI: <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0412>.
- Kale O. E., Akinpelu O. B., Bakare A. A., Yusuf F. O., Gomba R., Araka D. C. and Odutola O. 2018. Five traditional Nigerian Polyherbal remedies protect against high fructose fed, Streptozotocin-induced type 2 diabetes in male Wistar rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 18 (1): 1-11. DOI: [10.1186/s12906-018-2225-6](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2225-6)
- Kamal A., Biessels G. J., Duis S. E. and Gispen W. H. 2000. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia*. 43 (4): 500-6. DOI: [10.1007/s001250051335](https://doi.org/10.1007/s001250051335)
- Kang Q., and Yang C. 2020. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biology*. 3: 101799. DOI: [10.1016/j.redox.2020.101799](https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101799)
- Kawamura T., Umemura T., y Hotta N. 2012. Cognitive impairment in diabetic patients: Can diabetic control prevent cognitive decline?. *Journal of diabetes investigation*. 3(5): 413–423. [10.1111/j.2040-1124.2012.00234.x](https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2012.00234.x)
- Kean R.J., Lampion D.J., Dodd G.F., Freeman J.E., Williams C.M., Ellis J.A., Butler L.T. and Spencer J.P. 2015. Chronic consumption of flavanone-rich orange juice is associated with cognitive benefits: an 8-wk, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in healthy older adults. *Am. Journal Clinical. Nutrition*. 101: 506–514. Doi: [10.3945/ajcn.114.088518](https://doi.org/10.3945/ajcn.114.088518).
- Kihdze T. J., Mayowa A. A., Joseph O., Joseph O.C. E., Ghaife T. G., Bulus A., Aerschot A., Laekeman G. and Ganafa A. A. 2016. Phytochemical and antidiabetic evaluation of the methanolic stem bark extract of *Spathodea campanulata* (P. Beauv.) Bignoniaceae. *Pharmacognosy Journal*. 8 (3); 243-249.
- Kim H., Jang M. H., Shin M. C., Chang H. K., Lee T. H., Lim B. V., Jung C. Y., Lee C. Y., Kim E. H. and Kim C. J. 2003. *Folium mori* increases cell proliferation and neuropeptide Y expression in dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biology Pharmaceutical Bull.* 26 (4): 434-7. DOI: [10.1248/bpb.26.434](https://doi.org/10.1248/bpb.26.434)
- Kim K. K., Adelstein R. S. and Kawamoto S. 2009. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *Journal of Biological Chemistry*. 284(45): 31052-31061. DOI: [10.1074/jbc.M109.052969](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969)
- Kim S. J., Son T. G., Park H. R., Park M., Kim M. S., Kim H. S., Chung H. Y., Mattson M. P. and Lee J. 2008. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *Journal Biology Chemical*. 283 (21): 14497-505. DOI: [10.1074/jbc.M708373200](https://doi.org/10.1074/jbc.M708373200)
- Kim Y., Keogh J. B. and Clifton P. M. 2016. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 8 (1): 17. DOI: [10.3390/nu8010017](https://doi.org/10.3390/nu8010017)
- Kitabatake Y., Sailor K. A., Ming G. L., and Song H. 2007. Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories?. *Neurosurgery Clinics*. 18(1): 105-113. DOI: [10.1016/j.nec.2006.10.008](https://doi.org/10.1016/j.nec.2006.10.008)
- Kitamura T. and Inokuchi K. 2014. Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Molecular brain*. 7(1): 1-8. DOI: [10.1186/1756-6606-7-13](https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-13)

- Komada M., Takao K., and Miyakawa T. 2008. Elevated plus maze for mice. *Journal of visualized experiments*. 22: 1088. DOI: [10.3791/1088](https://doi.org/10.3791/1088)
- Kozłowska A. and Szostak-Wegierek D. 2014. Flavonoids-food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 65(2): 79-85. PMID: 25272572
- Kulkarni M., Singhal R. G., Bhise K., and Tambe R. 2014. Phytochemical screening, HPTLC studies and screening of antioxidant activity of extracts of leaves of *Spathodea campanulata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1), 08-13.
- Kumar G. P., Anilakumar K. R. and Naveen S. 2015. Phytochemicals Having Neuroprotective Properties from Dietary Sources and Medicinal Herbs. *Pharmacognosy Journal*, 7(1): 1-17.
- Kumaresan M., Palanisamy P. and Kumar P. Chemical investigation of flower of *Spathodea campanulata* by GC-MS. *Journal Natural Product Plant Resourse*. 1:14-7.
- Lamport D.J. and Williams C.M. 2021. Polyphenols and Cognition In Humans: An Overview of Current Evidence from Recent Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Brain Plast*.6 (2): 139-153. Doi: [10.3233/BPL-200111](https://doi.org/10.3233/BPL-200111).
- Lang B. T., Yan Y., Dempsey R. J. and Vemuganti R. 2009. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain research*. 1258: 25–33. DOI: [10.1016/j.brainres.2008.12.026](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.026)
- Lang B. T., Yan Y., Dempsey R. J. and Vemuganti R. 2009. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain Research*. 1258: 25-33. DOI: [10.1016/j.brainres.2008.12.026](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.026)
- Leclerc M., Dudonné S. and Calon F. 2021. Can Natural Products Exert Neuroprotection without Crossing the Blood–Brain Barrier?. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7): 3356. DOI: [10.3390/ijms22073356](https://doi.org/10.3390/ijms22073356)
- Lee C (a). W., You B. H., Yim S., Han S. Y., Chae H. S., Bae M., Kim S. Y., Yu J. E., Jung J., Nhoek P., Kim H., Choi H. S., Chin Y. W., Kim H. W. and Choi Y. H. 2023. Change of metformin concentrations in the liver as a pharmacological target site of metformin after long-term combined treatment with ginseng berry extract. *Frontiers in Pharmacology*. 14: 1148155. DOI: [10.3389/fphar.2023.1148155](https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1148155)
- Lee J., Noh S., Lim S. and Kim B. 2021. Plant extracts for type 2 diabetes: From traditional medicine to modern drug discovery. *Antioxidants*. 10(1): 81-93. DOI: [10.3390/antiox10010081](https://doi.org/10.3390/antiox10010081)
- Lee Y (b)., Park H. R., Lee J. Y., Kim J., Yang S., Lee C., Kim K., Kim H. S., Chang S. C. and Lee J. 2023. Low-dose curcumin enhances hippocampal neurogenesis and memory retention in young mice. *Archive Pharmacology Research*. Mar 22. DOI: [10.1007/s12272-023-01440-7](https://doi.org/10.1007/s12272-023-01440-7)
- Lende M, and Rijhsinghani A. 2020. Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *International Journal Environ Res Public Health*. 17(24): 9573-9589. DOI: [10.3390/ijerph17249573](https://doi.org/10.3390/ijerph17249573)
- Leuner B., Gould E. and Shors T. J. 2012. Is There A Link Between Adult Neurogenesis and Learning?. *Hippocampus*. 12 (5): 578–584. DOI:10.1002/hipo.10103
- Li J., Cesari M., Liu F., Dong B. and Vellas B. 2017. Effects of Diabetes Mellitus on Cognitive Decline in Patients with Alzheimer Disease: A Systematic Review. *Canadian Journal of Diabetes*. 41 (1): 114-119. DOI: [10.1016/j.jcjd.2016.07.003](https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2016.07.003)
- Li P., Qi L. W., Liu E. H., Zhou J. L. and Wen X. D. 2008. Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 27 (1): 66-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.11.005>.
- Li W. A., Moore-Langston S., Chakraborty T., Rafols J. A., Conti A. C. and Ding Y. 2013. Hyperglycemia in stroke and possible treatments. *Neurological Research*. 35: 479–491. DOI: [10.1179/1743132813Y.0000000209](https://doi.org/10.1179/1743132813Y.0000000209)
- Li Z. G., Zhang W., Grunberger G. and Sima A. A. 2002. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res*. 946: 221–231. DOI: [10.1016/s0006-8993\(02\)02887-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02887-1)

- Liaury K., Miyaoka T., Tsumori T., Furuya M., Wake R., Ieda M. and Horiguchi J. 2012. Morphological features of microglial cells in the hippocampal dentate gyrus of Gunn rat: a possible schizophrenia animal model. *Journal of neuroinflammation*. 9(1): 1-11. DOI: [10.1186/1742-2094-9-56](https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-56)
- Lien C. F., Chen S. J., Tsai M. C. and Lin C. S. 2021. Potential role of protein kinase C in the pathophysiology of diabetes-associated atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology*: 12: 1674- 1687. DOI: [10.3389/ffar.2021.716332](https://doi.org/10.3389/ffar.2021.716332)
- Liu Z. H., Chen H. G., Wu P. F., Yao Q., Cheng H. K., Yu W. and Liu C. 2015. *Flos Puerariae* Extract Ameliorates Cognitive Impairment in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Evidence Based Complement Alternative Medical*. 2015:873243. DOI: [10.1155/2015/873243](https://doi.org/10.1155/2015/873243)
- Liu Z., Kumar M. and Kabra A. 2022. Cucurbitacin B exerts neuroprotection in a murine Alzheimer's disease model by modulating oxidative stress, inflammation, and neurotransmitter levels. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 27(2): 71-79. DOI: [10.31083/j.fbl2702071](https://doi.org/10.31083/j.fbl2702071)
- Luchsinger A. J., Ryan D. C., and Lenore J. L. 2018. Diabetes in America. 3ª edición. Cap. 24. pp: 24-1 a 24-19. Editores; Cowie C.C., Casagrande S.S., y Menke A. J. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (EE. UU.).
- Luo X, Wu J, Jing S, Yan LJ. 2016. Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. *Aging and Disease*. 7: 90-110. DOI: [10.14336/AD.2015.0702](https://doi.org/10.14336/AD.2015.0702)
- Ma L., Wang J. and Li Y. 2015. Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clin Chim Acta*. 444:18–23. DOI: [10.1016/j.cca.2015.01.027](https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.027)
- Ma X., Xiao W., Li H., Pang P., Xue F., Wan L., Pei L. and Yan H. 2021. Metformin restores hippocampal neurogenesis and learning and memory via regulating gut microbiota in the obese mouse model. *Brain Behavior Immunity*. 95: 68-83. DOI: [10.1016/j.bbi.2021.02.011](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.02.011)
- Marengo D. A. y Lengua M. D. 2016. Más allá de la Diabetes mellitus: glicación de proteínas. *Biociencias*. 11(1): 105-11.
- Martínez-Castelao A., Navarro-González J., Górriz J. and de Alvaro, F. 2015. The concept and the epidemiology of diabetic nephropathy have changed in recent years. *Journal Clinical Medical*. 4: 1207–1216. DOI: [10.3390/jcm4061207](https://doi.org/10.3390/jcm4061207)
- Marzelli M. J., Mazaika P. K., Barnea-Goraly N., Hershey T., Tsalikian E., Tamborlane W., Mauras N., White N., Buckingham B., Kollman C., Cheng P. and Reiss A. L. 2014. Neuroanatomical correlates of dysglycemia in young children with type 1 diabetes. *Diabetes*. 63(1): 343-353. DOI: [10.2337/db13-0179](https://doi.org/10.2337/db13-0179)
- McEwen B. S., Magariños A. M., and Reagan L. P. 2002. Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes. *Journal of psychosomatic research*. 53 (4): 883-890. DOI: [10.1016/s0022-3999\(02\)00307-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3999(02)00307-0)
- Medina-Pérez E. A., Sánchez-Reyes A., Hernández-Peredo A. R., Martínez-López M. A., Jiménez-Flores C. N., Serrano-Ortiz I. y Cruz-González M. 2017. Diabetes gestacional. Diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención. *Medicina interna de México*. 33(1): 91-98.
- Meek T. H., Wisse B. E., Thaler J. P., Guyenet S. J., Matsen M. E., Fischer J. D., Taborsky G. J. Jr, Schwartz M. W. and Morton G. J. 2013. BDNF action in the brain attenuates diabetic hyperglycemia via insulin-independent inhibition of hepatic glucose production. *Diabetes*. 62 (5): 1512-8. Doi: [10.2337/db12-0837](https://doi.org/10.2337/db12-0837).
- Mellado-Orellana R., Salinas-Lezama E., Sánchez-Herrera D., Guajardo-Lozano J., Díaz-Greene E. J. y Rodríguez-Weber, F. L. 2019. Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 dirigido a pacientes con sobrepeso y obesidad. *Medicina interna de México*. 35 (4): 525-536.
- Miao Z., Wretinou H., Ren L., Bu N., Jiang L., Yang H. y Guo X. 2020. Long-term postpartum outcomes of insulin resistance and β -cell function in women with previous gestational diabetes mellitus. *International journal of endocrinology*. 2020. DOI: [10.1155/2020/7417356](https://doi.org/10.1155/2020/7417356)

- Mohammadi A, Amooeian V. G. and Rashidi E. 2018 Dysfunction in brain-derived neurotrophic factor signaling pathway and susceptibility to schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Current gene therapy*. 18 (1): 45–63. DOI: [10.2174/1566523218666180302163029](https://doi.org/10.2174/1566523218666180302163029)
- Moldogazieva N. T., Mokhosoev I. M., Mel'nikova T. I and Porozov Y. B. 2019. Terentiev Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxid Medical Cell Longev*. 5: 3085756. DOI: [10.1155/2019/3085756](https://doi.org/10.1155/2019/3085756)
- Moulton C. D., Costafreda S. G., Horton P., Ismail K. and Fu C. H. 2015. Meta-analyses of structural regional cerebral effects in type 1 and type 2 diabetes. *Brain Imaging and Behavior*. 9 (4): 651–662. DOI: [10.1007/s11682-014-9348-2](https://doi.org/10.1007/s11682-014-9348-2)
- Mousavi S. M., Niazmand S., Hosseini M., Hassanzadeh Z., Sadeghnia H. R., Vafae F. and Keshavarzi Z. 2015. Beneficial Effects of *Teucrium polium* and Metformin on Diabetes-Induced Memory Impairments and Brain Tissue Oxidative Damage in Rats. *International Journal Alzheimers Disease*. 2015:493729. DOI: [10.1155/2015/493729](https://doi.org/10.1155/2015/493729)
- Muñoz C. G., y Alfaya F. J. F. 2015. Plantas medicinales en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2: una revisión. *Farmacéuticos comunitarios*. 7(4): 27-34.
- Murillo-Ortíz B., Ramírez J., Ramos-Rodríguez E., Martínez-Garza S., Macías-Cervantes H., Solorio-Meza S. and Pereyra-Nobara T. 2016. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels and premature cognitive impairment/dementia in type 2 diabetes. *World Journal Diabetes*. 7 (20): 615-620. DOI: [10.4239/wjd.v7.i20.615](https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i20.615).
- Musen G., Tinsley L. J., Marcinkowski K. A., Pober D., Sun J. K., Khatri M., Keenan H. A. 2018. Cognitive function deficits associated with long-duration type 1 diabetes and vascular complications. *Diabetes Care*. 41(8): 1749-1756. DOI: [10.2337/dc17-1955](https://doi.org/10.2337/dc17-1955)
- Muthenna P., Akileshwari C., Saraswat M. and Reddy G. B. 2012. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. *British Journal Nutrition*. 107 (7): 941–949. DOI: [10.1017/S0007114511004077](https://doi.org/10.1017/S0007114511004077)
- Naranjo-Hernández Y. 2016. La diabetes mellitus: un reto para la Salud Pública. *Revista Finlay*. 6 (1): 1-8.
- Naya L. D. y Álvarez E. D. 2016. Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 12(17): 935-946.
- Ngouela S., Tsamo E. and Sondengam B. L. 1988. Extractives from Bignoniaceae: constituents of the stem bark of *Spathodea campanulata*. *Planta Médica, Stuttgart*. 54 (5): 476-489.
- Ngouela S., Tsamo E., Sondengam B. L. and Connolly J. D. 1991. Spathodol, a new polyhydroxysterol from the leaves of *Spathodea campanulata*. *Journal of Natural Products, Washington*. 54 (3): 873-876.
- Niyonzima G., Laekeman G. M., Scharpe S., Mets T. and Vlierinck A. 1990. Hypoglycemic activity of *Spathodea campanulata* bark decoctions on streptozotocin-diabetic mice. *Plant Medical*. 56: 682. DOI: [10.1055/s-2006-961354](https://doi.org/10.1055/s-2006-961354).
- Niyonzima G., Laekeman G. M., Scharpe S., Mets T., Van Beeck L. and Vlietinck A. J. 1993. Hypoglycemic activity of *Spathodea campanulata* stem bark decoction in mice. *Phytotherapy Research*. 7: 64-67. DOI: [10.1002/ptr.2650070115](https://doi.org/10.1002/ptr.2650070115).
- Niyonzima G., Laekeman G., Witvrouw M., Van Poel B., Pieters L., Paper D., Clercq E., Franz G. and Vlietinck A. J. 1999. Hypoglycemic, anticomplement and anti-HIV activities of *Spathodea campanulata* stem bark. *Phytomedicine, Jena*. 6 (1): 45-49. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80034-8)
- Norma Oficial Mexicana 062-ZOO. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario oficial. Consultada en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf el 04/07/2021.
- Ofori-Kwakye K., Kwapong A. A. and Adu F. 2009. Antimicrobial activity of extracts and topical products of the stem bark of *Spathodea campanulata* for wound healing. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 6 (2):168-74. DOI: [10.4314/ajtcam.v6i2.57089](https://doi.org/10.4314/ajtcam.v6i2.57089)

- Olatunji O. J., Zuo J. and Olatunde O. O. 2021. *Securidaca inappendiculata* stem extract confers robust antioxidant and antidiabetic effects against high fructose/streptozotocin induced type 2 diabetes in rats. Exploration of bioactive compounds using UHPLC-ESI-QTOF-MS. *Archives Physiology Biochemistry*. 13:1-13. DOI: [10.1080/13813455.2021.1921811](https://doi.org/10.1080/13813455.2021.1921811)
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2022. Diabetes. Consultado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> consultado el 02/05/2023.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2018. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Consultado en <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Revision%20TG%20408%202018.pdf> el 04/07/2021.
- Orozco M. F., Vázquez-Hernández A. and Fenton-Navarro B. 2019. Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects. *Phyton*. 88 (1): 1-10.
- Ott C., Jacobs K., Haucke A. H., Navarrete-Santos T. Grune A. S. 2014. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*. 2: 411-429. DOI: [10.1016/j.redox.2013.12.016](https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.016)
- Overstreet-Wadiche L. S. and Westbrook GL. 2006. Functional maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus*. 16: 208–215. DOI: [10.1002/hipo.20152](https://doi.org/10.1002/hipo.20152)
- Padhi S., Nayak A. K. and Behera A. 2020. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 131: 1-23. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110708](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708)
- Pandey K. B. and Rizvi S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2(5): 270-278. DOI: [10.4161/oxim.2.5.9498](https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498)
- Pang X., Makinde E. A., Eze F. N. and Olatunji O. J. 2021. *Securidaca inappendiculata* Polyphenol Rich Extract Counteracts Cognitive Deficits, Neuropathy, Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Encephalopathic Rats via p38 MAPK/Nrf2/HO-1 Pathways. *Frontiers Pharmacology*. 12: 737764. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.737764>
- Park G., Lee J.Y., Han H.M., An H.S., Jin Z., Jeong E.A. and Roh G.S. 2021. Ablation of dynamin-related protein 1 promotes diabetes-induced synaptic injury in the hippocampus. *Cell death & disease*. 12 (5): 1-15. DOI: [10.1038/s41419-021-03723-7](https://doi.org/10.1038/s41419-021-03723-7)
- Park H. R., Kim J. Y., Lee Y., Chun H. J., Choi Y. W., Shin H. K., Choi B. T., Kim C. M. and Lee J. 2016. PMC-12, a traditional herbal medicine, enhances learning memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Neuroscience Letters*. 617:254-63. DOI: [10.1016/j.neulet.2016.02.036](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.036)
- Patel D. K., Prasad S. K., Kumar R. and Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2 (4): 320-330. DOI: [10.1016/S2221-1691\(12\)60032-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60032-X)
- Patel S. S and Udayabanu M. 2014. *Urtica dioica* extract attenuates depressive like behavior and associative memory dysfunction in dexamethasone induced diabetic mice. *Metabolic Brain Disease*. 29 (1): 121-30. DOI: [10.1007/s11011-014-9480-0](https://doi.org/10.1007/s11011-014-9480-0)
- Patel S. S., Ray R. S., Sharma A., Mehta V., Katyal A. and Udayabanu M. 2018. Antidepressant and anxiolytic like effects of *Urtica dioica* leaves in streptozotocin induced diabetic mice. *Metabolic Brain Disease*. 33 (4): 1281-1292. DOI: [10.1007/s11011-018-0243-1](https://doi.org/10.1007/s11011-018-0243-1)
- Patro G., Kumar B. S., Kumar M. B. 2016. Effects of *Mimosa pudica* L. leaves extract on anxiety, depression and memory. *Avicenna Journal Phytomedical*. 6 (6): 696-710. PMID: [28078250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28078250/)
- Paxinos G. and Watson C. 2009. Chemoarchitectonic atlas of the rat brain. Ed. Elseiver. pp: 375. E.U.A.
- Petersen M. C., and Shulman G. I. 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews*. 98(4): 2133–2223. DOI: [10.1152/physrev.00063.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017)

- Pianaro A., Ferreira D. T., Pinto J. P., Ishikawa N. K. and Braz-Filho R. 2007. Iridoid glucoside and antifungal phenolic compounds from *Spathodea campanulata* roots. *Semina: Ciências Agrárias* 28: 251-256.
- Pintana H., Apaijai N., Pratchayasakul W., Chattipakorn N. and Chattipakorn S. C. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Science*. 91 (11-12): 409-414. DOI: [10.1016/j.lfs.2012.08.017](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.017)
- Piotrowski P., Wierzbicka K. and Smiałek M. 2001. Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants. *Folia Neuropathology*. 39 (3):147-54. PMID: 11770125.
- Pipatpiboon N., Pratchayasakul W., Chattipakorn N. and Chattipakorn S. C. 2012. PPAR γ agonist improves neuronal insulin receptor function in hippocampus and brain mitochondria function in rats with insulin resistance induced by long term high-fat diets. *Endocrinology*. 153 (1): 329-38. DOI: [10.1210/en.2011-1502](https://doi.org/10.1210/en.2011-1502)
- Piwowar A., Rembiałkowska N., Rorbach-Dolata A., Garbiec A., Ślusarczyk S., Dobosz A., Długosz A., Marchewka Z., Matkowski A. and Saczko J. 2020. *Anemarrhenae asphodeloides rhizoma* Extract Enriched in Mangiferin Protects PC12 Cells against a Neurotoxic Agent-3-Nitropropionic Acid. *International Journal Molecular Science*. 21 (7): 2510. DOI: [10.3390/ijms21072510](https://doi.org/10.3390/ijms21072510)
- Plows J.F., Stanley J.L., Baker P.N., Reynolds C., Vickers M.H. 2018. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal Molecular Science*. 19 (3): 3342-3359. DOI: [10.3390/ijms19113342](https://doi.org/10.3390/ijms19113342)
- Plümpe T., Ehninger D., Steiner B., Klempin F., Jessberger S., Brandt M. and Kempermann G. 2006. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC neuroscience*. 7(1): 1-14. DOI: [10.1186/1471-2202-7-77](https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-77)
- Pop-Busui R., Boulton A. J., Feldman E. L., Bril V., Freeman R., Malik R. A. and Ziegler D. 2017. Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. 40(1): 136-154. DOI: [10.2337/dc16-2042](https://doi.org/10.2337/dc16-2042)
- Potì F., Santi D., Spaggiari G., Zimetti F. and Zanotti I. 2019. Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis. *International Journal Molecular Science*. 16; 20 (2): 351.
- Quiñones M., Miguel M., and Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*. 27(1): 76-89.
- Rababa'h A. M., Mardini A. N., Alzoubi K. H., Ababneh M. A. and Athamneh R. Y. 2019. The effect of cilostazol on hippocampal memory and oxidative stress biomarkers in rat model of diabetes mellitus. *Brain research*. 1715 (2): 182-187. DOI: [10.1016/j.brainres.2019.03.025](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.025)
- Ramos-Rodriguez J. J., Molina-Gil S., Ortiz-Barajas O., Jimenez-Palomares M., Perdomo G., Cozar-Castellano I. and Garcia-Alloza M. 2014. Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One*. 9(2), e89229. DOI: [10.1371/journal.pone.0089229](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089229)
- Ramos-Rodriguez J. J., Ortiz O., Jimenez-Palomares M., Kay K. R., Berrocoso E., Murillo-Carretero M. I., Perdomo G., Spires-Jones T., Cozar-Castellano I., Lechuga-Sancho A. M. and Garcia-Alloza M. 2013. Differential central pathology and cognitive impairment in pre-diabetic and diabetic mice. *Psychoneuroendocrinology*. 38 (11): 2462-2475. DOI: [10.1016/j.psyneuen.2013.05.010](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.05.010)
- Renaud J. and Martinoli M.G. 2019. Considerations for the Use of Polyphenols as Therapies in Neurodegenerative Diseases. *International Journal Molecular Science*. 20 (8): 1883. Doi: [10.3390/ijms20081883](https://doi.org/10.3390/ijms20081883).
- Reyes O. A. J. y Arellano P. A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB*. 27 (1): 9-18.
- Reyes S. F. A., Pérez A. M. L., Alfonso F. E., Ramírez E. M. y Jiménez R. Y. 2016. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo científico médico*. 20 (1): 98-121.
- Rigoglio N. N., Barreto R. S., Favaron P. O., Jacob J. C., Smith L. C., Gastal M. O., Gastal E. L. and Miglino M. A. 2017. Central nervous system and vertebrae development in horses: a chronological study with differential temporal expression of nestin and GFAP. *Journal of Molecular Neuroscience*. 61(1): 61-78. DOI: [10.1007/s12031-016-0805-9](https://doi.org/10.1007/s12031-016-0805-9)

- Rodríguez F. R. y Córdoba G. T. 2009. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Llama del Bosque. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*. 6 (16): 63-65.
- Rodríguez-Vera D., Abad-García A., Vargas-Mendoza N., Pinto-Almazán R., Farfán-García E. D., Morales-González J. A. and Soriano-Ursúa M. A. 2022. Polyphenols as potential enhancers of stem cell therapy against neurodegeneration. *Neural Regeneration Research*. 17 (10): 2093-2101. DOI: [10.4103/1673-5374.335826](https://doi.org/10.4103/1673-5374.335826)
- Rojas-García A., Fernández-Ochoa Á., Cádiz-Gurrea M.L., Arráez-Román D. and Segura-Carretero A. 2023. Neuroprotective Effects of Agri-Food By-Products Rich in Phenolic Compounds. *Nutrients*. 15 (2): 449. Doi: 10.3390/nu15020449.
- Roriz-Filho J. S., Sá-Roriz T. M., Rosset I., Camozzato A. L., Santos A. C., Chaves M. L. and Roriz-Cruz M. 2009. (Pre) diabetes, brain aging, and cognition. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular basis of disease*. 1792(5): 432-443. DOI: [10.1016/j.bbadis.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.003)
- Rozanska O., Uruska A. and Zozulinska-Ziolkiewicz D. 2020. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. *International Journal of Molecular Science*. 21 (3): 841. Doi: 10.3390/ijms21030841.
- Sadeghi A., Hami J., Razavi S., Esfandiary E. and Hejazi Z. 2016. The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: cellular and molecular aspects. *International journal of preventive medicine*. 7: 35- 43.
- Saedi E., Gheini M. R., Faiz F. and Arami M. A. 2016. Diabetes mellitus and cognitive impairments. *World journal of diabetes*. 7(17): 412-422). [10.4103/2008-7802.178531](https://doi.org/10.4103/2008-7802.178531)
- Sánchez-Zúñiga M. D. J., Carrillo-Esper R., Sánchez-Pérez H., González-Chávez A., y Elizondo-Argueta S. 2020. Circuito insulínico cerebral. De las bases a su impacto en la clínica. *Cirugía y cirujanos*. 88(1): 100-106.
- Santos V. H., Minatel I. O., Lima G. P., Silva R. M. and Chen C. Y. O. 2020. Antioxidant capacity and phytochemical characterization of *Spathodea campanulata* growing in different climatic zones in Brazil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 24: 101536-101544.
- Santulli G, Lombardi A, Sorriento D, Anastasio A, Del Giudice C, Formisano P, Béguinot F, Trimarco B, Miele C, and Laccarino G. 2012. Age-related impairment in insulin release: the essential role of β (2)-adrenergic receptor. *Diabetes*. ZHA61: 692-701. DOI: [10.2337/db11-1027](https://doi.org/10.2337/db11-1027)
- Sanzana M. G., y Durruty P. 2016. Otros tipos específicos de diabetes mellitus. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 27(2): 160-170.
- Sasikumar P., Aswathy M., Prem P. T., Radhakrishnan K. V. and Chakrapani P. S. B. 2022. Plant derived bioactive compounds and their potential to enhance adult neurogenesis. *Phytomedicine plus*. 2 (1): 100191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phyflu.2021.100191>
- Secretaría de Salud. 2023. Sistema de vigilancia epidemiológica hospitalaria de diabetes mellitus 2. Informe epidemiológico de corte 9 de Enero 2023. Dirección general de epidemiología. Gobierno de México. Consultado en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/802702/Informe_SVEHDMT2_Corte4T2022-.pdf el 09/05/2023.
- Sedlak J. and Lindsay R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 25: 192-205. DOI: 10.1016/0003-2697(68)90092-4
- Seki M., Tanaka T., Nawa H., Usui T., Fukuchi T., Ikeda K., Abe H. and Takei N. 2004. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes*. 53(9): 2412-2429. DOI: [10.2337/diabetes.53.9.2412](https://doi.org/10.2337/diabetes.53.9.2412)
- Sen S. and Chakraborty R. 2017. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. *Journal Traditional Complementary and Medical*. 7 (2): 234-244.

- Shin M. S., Kim S. K., Kim Y. S., Kim S. E., Ko I. G., Kim Y. S., Kim C. J., Kim Y. M., Kim B. K. and Kim T. S. 2008. Aqueous extract of *Anemarrhena rhizome* increases cell proliferation and neuropeptide Y expression in the hippocampal dentate gyrus on streptozotocin-induced diabetic rats. *Fitoterapy*. 79 (5): 323-327. DOI: [10.1016/j.fitote.2008.02.014](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.02.014)
- Shors T. J., Townsend D. A., Zhao M., Kozorovitskiy Y. and Gould E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 12 (5): 578-84. DOI: [10.1002/hipo.10103](https://doi.org/10.1002/hipo.10103)
- Sierra A., Encinas J. M. and Maletic-Savatic M. 2011. Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging. *Frontiers in neuroscience*. 5: 47-61. DOI: [10.3389/fnins.2011.00047](https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00047)
- Silva R. F., and Pogačnik L. 2020. Polyphenols from food and natural products: Neuroprotection and safety. *Antioxidants*.9(1): 61-76. DOI: [10.3390/antiox9010061](https://doi.org/10.3390/antiox9010061)
- Silveira A. C., Dias J. P., Santos V. M., Oliveira P. F., Alves M. G., Rato L. and Silva B. M. 2019. The Action of Polyphenols in Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: A Common Agent for Overlapping Pathologies. *Current neuropharmacology*. 17(7): 590–613. DOI: [10.2174/1570159X16666180803162059](https://doi.org/10.2174/1570159X16666180803162059)
- Śmieszek A., Stręk Z., Kornicka K., Grzesiak J., Weiss C. and Marycz K. 2017. Antioxidant and Anti-Senescence Effect of Metformin on Mouse Olfactory Ensheathing Cells (mOECs) May Be Associated with Increased Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels-An Ex Vivo Study. *International Journal Molecular Science*. 18 (4): 872. Doi: [10.3390/ijms18040872](https://doi.org/10.3390/ijms18040872).
- Sridhar G. R., Lakshmi G. and Nagamani G. 2015. Emerging links between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *World Journal Diabetes*. 6: 744–751. DOI: [10.4239/wjd.v6.i5.744](https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i5.744)
- Sritawan N., Sirichoat A., Aranarochana A., Pannangrong W., Wigmore P. and Welbat J. U. 2023. Protective effect of metformin on methotrexate induced reduction of rat hippocampal neural stem cells and neurogenesis. *Biomedical Pharmacother*. 162: 114613. DOI: [10.1016/j.biopha.2023.114613](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114613)
- Srivastava P., Dhuriya Y. K., Kumar V., Srivastava A., Gupta R., Shukla R. K. and Khanna V. K. 2018. PI3K/Akt/GSK3 β induced CREB activation ameliorates arsenic mediated alterations in NMDA receptors and associated signaling in rat hippocampus: *Neuroprotective role of curcumin*. *Neurotoxicology*. 67: 190-205. DOI: [10.1016/j.neuro.2018.04.018](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.04.018)
- Strachan M. W., Visseren F. L., Kappelle L. J. and Whitmer R. A. 2014. Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2: 246–255. DOI: [10.1016/S2213-8587\(13\)70088-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70088-3)
- Sun Q., Tang D.D., Yin E.G., Wei L.L., Chen P., Deng S.P. and Tu L.L. 2018. Diagnostic Significance of Serum Levels of Nerve Growth Factor and Brain Derived Neurotrophic Factor in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Medical Science Moniting*. 26 (24): 5943-5950. DOI: [10.12659/MSM.909449](https://doi.org/10.12659/MSM.909449).
- Świątek Ł., Sieniawska E., Sinan K.I., Zengin G., Uba A.I., Bene K., Maciejewska-Turska M., Rajtar B., Polz-Dacewicz M. and Aktumsek A. 2022. Bridging the Chemical Profiles and Biological Effects of *Spathodea campanulata* Extracts: A New Contribution on the Road from Natural Treasure to Pharmacy Shelves. *Molecules*. 22; 27 (15): 4694. DOI: [10.3390/molecules27154694](https://doi.org/10.3390/molecules27154694)
- Taika B. B., Bouckandou M., Souza A., Bourobou H. B., MacKenzie L. S., and Lione L. 2018. An overview of anti-diabetic plants used in Gabon: Pharmacology and toxicology. *Journal of ethnopharmacology*. 216 (3): 203-228. DOI: [10.1016/j.jep.2017.12.036](https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.036)
- Tan X., Fang P., An J., Lin H., Liang Y., Shen W., Leng X., Zhang C., Zheng Y. and Qiu S. 2016. Micro-structural white matter abnormalities in type 2 diabetic patients: a DTI study using TBSS analysis. *Neuroradiology*. 58(12): 1209-1216. DOI: [10.1007/s00234-016-1752-4](https://doi.org/10.1007/s00234-016-1752-4)
- Tanayen J. K., Ajayi A. M., Ezeonwumelu J. O. C., Oloro J., Tanayen G. G., Adzu B. and Agaba, A. G. 2014. Antidiabetic Properties of an Aqueous-Methanolic Stem Bark Extract of *Spathodea campanulata* (Bignoniaceae) P. Beauv. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5(5), 163–168. DOI: [10.5530/pj.2016.3.12](https://doi.org/10.5530/pj.2016.3.12)

- Teinkela M. J. E., Nguedia A. J., Meyer F., Donfack V. E., Ndjakou L. B., Ngouela S., Tsamo E., Adiogo D., Azebaze B. A. and Wintjens R. 2016. In vitro antimicrobial and anti-proliferative activities of plant extracts from *Spathodea campanulata*, *Ficus bubu*, and *Carica papaya*. *Pharmaceutical Biology*. 54 (6): 1086-1095. DOI: [10.3109/13880209.2015.1103273](https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1103273)
- Teng H. and Chen L. 2019. Polyphenols and bioavailability: An update. *Critical reviews in food science and nutrition*. 59 (13): 2040-2051. DOI: [10.1080/10408398.2018.1437023](https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437023)
- Thakur A. K., Chatterjee S. S. and Kumar V. 2013. Beneficial effects of *Brassica juncea* on cognitive functions in rats. *Pharmaceutical Biology*. 51 (10): 1304-1310. DOI: [10.3109/13880209.2013.789917](https://doi.org/10.3109/13880209.2013.789917)
- Thakur A. K., Rai G., Chatterjee S. S. and Kumar V. 2016. Beneficial effects of an *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on cognitive functions in streptozotocin-induced diabetic rats. 54 (9): 1528-1538. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1107107>
- Tian R., Yang W., Xue Q., Gao L., Huo J., Ren D. and Chen X. 2016. Rutin ameliorates diabetic neuropathy by lowering plasma glucose and decreasing oxidative stress via Nrf2 signaling pathway in rats. *Europe Journal Pharmacology*. 771: 84-92. DOI: [10.1016/j.ejphar.2015.12.021](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.12.021)
- Tokarz V. L., MacDonald P. E. and Klip A. 2018. The cell biology of systemic insulin function. *The Journal of cell biology*. 217 (7): 2273-2289. DOI: [10.1083/jcb.201802095](https://doi.org/10.1083/jcb.201802095)
- Torres-Fernández O. 2006. La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal (The Golgi silver impregnation method: commemorating the centennial of the Nobel Prize in medicine (1906) shared by Camillo Golgi and Santiago Ramón y Cajal). *Biomedica*. 26 (4): 498-508.
- 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. DOI: [10.1007/s11010-009-0184-4](https://doi.org/10.1007/s11010-009-0184-4)
- Ünal E., Akan O. and Üçler S. 2015. Diyabetin komplikasyonları. *Okmeydanı Tıp Dergisi*. 31: 45-51.
- Unuofin J. O. and Lebelo S. L. 2020. Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of type 2 diabetes: an updated review. *Oxidative medicine and cellular longevity*. DOI: [10.1155/2020/1356893](https://doi.org/10.1155/2020/1356893)
- Vázquez-Jiménez J. G., Roura-Guiberna A., Jiménez-Mena L. R., y Olivares-Reyes J. A. 2017. El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. *Gaceta Médica de México*. 153: 852-863.
- Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. 2015. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiology Disease*. 84: 22-38. DOI: [10.1016/j.nbd.2015.04.008](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.008)
- Verpoorte R., Choi Y. H. and Kim H. K. 2005. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. *Journal Ethnopharmacology*. 100 (1-2): 53-6. DOI: [10.1016/j.jep.2005.05.033](https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.033)
- Vetter S. W. 2015. Glycated serum albumin and AGE receptors. *Advances in Clinical Chemistry*. 72: 205-275. DOI: [10.1016/bs.acc.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.07.005)
- Vinik A. I. (a), Casellini C. and Nevoret M. L. Diabetic Neuropathies. 2018. Editores; Feingold K. R., Anawalt B. y Boyce A. Endotexto. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279175/#diab-neuropathies.toc-diabetic-neuropathies-prospects-for-the-future> el 23/06/2021.
- Vinik A. I. (b), Casellini C. and Neuman S. 2018. Diabetes y sistema nervioso. En: Bonora E., DeFronzo R. (eds) Diabetes Complications, Comorbidities and Related Disorders. Endocrinología. Springer, Cham. Consultado en: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-319-27316-7_10-1#citeas el 23/06/2021.
- Vinik A., Maser R. E. and Ziegler D. 2010. Neuropathy: The Crystal Ball for Cardiovascular Disease?. *Diabetes Care*. 33 (5):1688-1690. DOI: [10.2337/dc10-0745](https://doi.org/10.2337/dc10-0745)

- Wagh A., Butle S. and Raut D. 2021. Isolation, identification, and cytotoxicity evaluation of phytochemicals from chloroform extract of *Spathodea campanulata*. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7; 58 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00205-7>.
- Walf A. A. and Frye C. A. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocol*. 2 (2): 322-328. DOI: [10.1038/nprot.2007.44](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44)
- Wang C. Y. and Achenbach J. D. 1994. Elastodynamic fundamental solutions for anisotropic solids. *Geophysical Journal International*. 118 (2): 384-392.
- Wang F. Y. J. and Zou Y. Y. 2019. Expression changes of NMDA and AMPA receptor subunits in the hippocampus in rats with diabetes induced by streptozotocin coupled with memory impairment. *Neurochemical research*. 44 (4): 978-993. DOI: [10.1007/s11064-019-02733-4](https://doi.org/10.1007/s11064-019-02733-4)
- Wang H., Zhu C., Ying Y., Luo L., Huang D. and Luo Z. 2017. Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases. *Oncotarget*. 9 (11): 10135-10146. DOI: [10.18632/oncotarget.20807](https://doi.org/10.18632/oncotarget.20807)
- Wang J., Duan P., Cui Y., Li Q. and Shi Y. 2016. Geniposide alleviates depression-like behavior via enhancing BDNF expression in hippocampus of streptozotocin-evoked mice. *Metabolic Brain Disease*. 31 (5): 1113-22. [10.1007/s11011-016-9856-4](https://doi.org/10.1007/s11011-016-9856-4)
- Wang J., Wang C., Li S., Li W., Yuan G., Pan Y. and Chen H. 2017. Anti-diabetic effects of Inonotus obliquus polysaccharides in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice and potential mechanism via PI3K-Akt signal pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 95: 1669–1677. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.09.104](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.104)
- Willcox M. L., Elugbaju C., Al-Anbaki M., Lown M. and Graz B. 2021. Effectiveness of Medicinal Plants for Glycaemic Control in Type 2 Diabetes: An Overview of Meta-Analyses of Clinical Trials. *Frontiers in Pharmacology*. 12: 777561. DOI: [10.3389/fphar.2021.777561](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777561)
- Wu C., Yang L., Li Y., Dong Y., Yang B., Tucker L. D., Zong X. and Zhang Q. 2020. Effects of Exercise Training on Anxious-Depressive-like Behavior in Alzheimer Rat. *Medicine and science in sports and exercise*. 52(7): 1456–1469. DOI: [10.1249/MSS.0000000000002294](https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002294)
- Wu J., Jin Z. and Yan L. J. 2017. Redox imbalance and mitochondrial abnormalities in the diabetic lung. *Redox Biology*. 11 (3): 51– 59. PMID: DOI: [10.1016/j.redox.2016.11.003](https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.003)
- Xia W., Chen Y. C., and Ma J. 2017. Resting-state brain anomalies in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Frontiers in aging neuroscience*. 9: 14-21. DOI: [10.3389/fnagi.2017.00014](https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00014)
- Xie F., Chan J. C., and Ma R. C. 2018. Precision medicine in diabetes prevention, classification and management. *Journal of diabetes investigation*. 9 (5): 998–1015. DOI: [10.1111/jdi.12830](https://doi.org/10.1111/jdi.12830)
- Yamaoka I., Katsuta S. and Nagatani Y. 1983. Silver-impregnation of the Golgi complex in epididymal epithelial cells of mice. *Cell Structure Function*. 8(4): 339-346. DOI: [10.1247/csf.8.339](https://doi.org/10.1247/csf.8.339)
- Yan L. J. 2018. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: role of the polyol pathway. *Animal models and experimental medicine*. 1(1): 7-13. DOI: [10.1002/ame2.12001](https://doi.org/10.1002/ame2.12001)
- Yan L., Guo M. S., Zhang Y., Yu L., Wu J. M., Tang Y., Ai W., Zhu F. D., Law B. Y., Chen Q., Yu C. L., Wong V. K., Li H., Li M, Zhou XG, Qin DL, Wu AG. 2022. Dietary Plant Polyphenols as the Potential Drugs in Neurodegenerative Diseases: Current Evidence, Advances, and Opportunities. *Oxidative Medical Cell Longevity*. 2022: 5288698. DOI: [10.1155/2022/5288698](https://doi.org/10.1155/2022/5288698)
- Yang H. K., Lee S. H., Shin J., Choi Y. H., Ahn Y. B., Lee B. W., Rhee E. J., Min K. W. and Yoon K. H. 2019. Acarbose Add-on Therapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Metformin and Sitagliptin Failure: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Diabetes Metabolic Journal*. 43 (3): 287-301. DOI: [10.4093/dmj.2018.0054](https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0054)

- Yang H., Fan S., Song D., Wang Z., Ma S., Li S. and Wang X. 2013. Long-term streptozotocin-induced diabetes in rats leads to severe damage of brain blood vessels and neurons via enhanced oxidative stress. *Molecular medicine reports*. 7 (2): 431-440. DOI: [10.3892/mmr.2012.1227](https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1227)
- Yang L., Wen K. S., Ruan X., Zhao Y. X., Wei F. and Wang Q. 2018. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*. 23 (4):762-779. DOI: [10.3390/moléculas23040762](https://doi.org/10.3390/moléculas23040762)
- Yang W. M., Shim K. J., Choi M. J., Park S. Y., Choi B. J., Chang M. S. and Park S. K. 2008. Novel effects of Nelumbo nucifera rhizome extract on memory and neurogenesis in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neuroscience Letter*. 443 (2): 104-7. DOI: [10.1016/j.neulet.2008.07.020](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.020)
- Ye S., Xie D. J., Zhou P., Gao H. W., Zhang M. T., Chen D. B. and Shen G. M. 2021. Huang-Pu-Tong-Qiao Formula Ameliorates the Hippocampus Apoptosis in Diabetic Cognitive Dysfunction Mice by Activating CREB/BDNF/TrkB Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021*. DOI: [10.1155/2021/5514175](https://doi.org/10.1155/2021/5514175)
- Zanolini J. M., Morais H., Dias I. C., Schreiber A. K., Souza C. P. and Cunha J. M. Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment. *Current Diabetes Reviews*. 2016;12(3):165-78. DOI: [10.2174/1573399811666150515125349](https://doi.org/10.2174/1573399811666150515125349)
- Zhang S., Xue R. and Hu R. 2020. The neuroprotective effect and action mechanism of polyphenols in diabetes mellitus-related cognitive dysfunction. *European journal of nutrition*. 59 (4): 1295-1311. DOI: [10.1007/s00394-019-02078-2](https://doi.org/10.1007/s00394-019-02078-2)
- Zhang W. J., Tan Y. F., Yue J. T., Vranic M., Wojtowicz J. M. 2009. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. *Acta Neurolog Scand*. 117: 205-10. DOI: [10.1111/j.1600-0404.2007.00928.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00928.x)
- Zhang W., Zhao W., Wang J., Xu Q., Li S. and Yin C. 2020. Imaging Diagnosis of Central Nervous System Damage in Patients with T2DM. *Neuroscience Letters*. 733: 135092-135100. DOI: [10.1016/j.neulet.2020.135092](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135092)
- Zhang Y. W., Zhang J. Q., Liu C., Wei P., Zhang X., Yuan Q. Y., Yin X. T., Wei L. Q., Cui J. G. and Wang J. 2015. Memory dysfunction in type 2 diabetes mellitus correlates with reduced hippocampal CA1 and subiculum volumes. *Chin Med J*. 20; 128 (4): 465-471. DOI: 10.4103/0366-6999.151082.
- Zhao C., Teng E. M., Summers R. G., Ming G. L., and Gage F. H. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 26 (1): 3-11. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006)
- Zhen Y. F., Zhang J., Liu X. Y, Fang H., Tian L.B., Zhou D.H., Kosten T.R. and Zhang X.Y. 2013. Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes. *Psychopharmacology (Berl)*. 227: 93-100. DOI: [10.1007/s00213-012-2942-3](https://doi.org/10.1007/s00213-012-2942-3)
- Zheng H. L. I. 2017. Complicaciones crónicas de la diabetes mellitus tipo 2. pp: 9-20. Tesis doctoral. Facultad de farmacia. Universidad Complutense. Madrid, España.
- Zheng Y., Ley S. H., and Hu F. B. 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 14 (2): 88-98. DOI: [10.1038/nrendo.2017.151](https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151)

XIII. ANEXOS

Anexo 1

