



Título: Efecto antilipoperoxidante de *Plukenetia volubilis* L. (Sacha inchi) en ratas con diabetes inducida por aloxano.

Antilipoperoxidant effect *Plukenetia volubilis* L. (Sacha inchi) in rats with alloxan-induced diabetes.

Autores

Christian Manuel Cabeza Luján, Jesulin Emilio Campos Muñoz, Juan Manuel Pesantes Calderón, Sallie Angela Vega Arqueros, María Esperanza Zegarra Zegarra, Carlos Eduardo Quisse Sánchez, Paul Anthony Piminchumo Olivos, Elisa María Paredes Reyes, Carla Melissa Rodríguez Roca, Sofía Stefany Rojas Vidal, Alejandro Sebastián Pérez Sánchez, Héctor Uladismiro Rodríguez Barboza, Jorge Omar Plasencia Álvarez



Resumen:

Objetivo: Demostrar el efecto antilipoperoxidante de *Plukenetia volubilis L.* (Sacha inchi) en ratas con diabetes inducida por aloxano. **Método:** Se diseñó un estudio experimental de casos y controles. 28 ratas con diabetes inducida por aloxano, fueron distribuidas al azar en 4 grupos: (G0) Grupo control que recibieron 0,64 ml/kg de etanol, (G1) Grupo estándar tratado con de 0,25 ml/kg de vitamina E, (G2) Grupo Experimental tratado con 120 mg/kg de extracto fluido de Sacha inchi, (G3) Grupo Experimental tratado con 140 mg/kg de extracto fluido de Sacha inchi. En todos los especímenes se determinó nivel sérico de malondialdehído (MDA) a los 16 días de iniciado el experimento. **Resultados:** G1 mostró una reducción significativa de los niveles de Malondialdehído (MDA) sérico de 30% con respecto al control. El grupo G2, aproximadamente del 16.18% con respecto al control y el grupo G3 también mostró una reducción significativa del 23.5% con respecto al grupo control. **Conclusión:** la administración del extracto fluido de hojas de *Plukenetia Volubilis L.* in vivo tiene efecto antilipoperoxidante en ratas con diabetes inducida por aloxano.

Palabras clave: lipoperoxidación, glicemia, *Plukenetia volubilis L.*, diabetes, estrés oxidativo.



Summary:

In order to demonstrate the effect of *Plukenetia antilipoperoxidant L. volubilis* (Sacha inchi) in rats with alloxan-induced diabetes. Method: A pilot case-control study was designed. 28 rats with alloxan-induced diabetes were randomly distributed in 4 groups: (G0) Control group that received 0.64 ml / kg of ethanol, (G1) Standard Group treated with 0.25 ml / kg of vitamin E, (G2) Experimental group treated with 120 mg / kg Sacha Inchi fluid extract, (G3) Experimental group treated with 140 mg / kg of fluid extract Sacha Inchi.

In all specimens serum level of malondialdehyde (MDA) was determined at 16 days into the experiment. Results: G1 showed a significant reduction of serum levels of malondialdehyde (MDA) 30% over the control. Group G2, approximately 16.18% over the control and the group G3 also showed significant reduction of 23.5% over the control group. Conclusion: The administration leaf extract *Plukenetia Volubilis L* has antilipoperoxidant effect in vivo in rats.

Keywords: lipid peroxidation, blood glucose, *Plukenetia volubilis L.*, diabetes, oxidative stress.



I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica, caracterizada por hiperglicemia, poliuria, polifagia, y pérdida de peso. En función a su etiología se consideran 2 tipos la diabetes tipo I dependiente de un déficit de insulina y la diabetes tipo II por déficit o mal función del receptor de insulina.¹

En el 2013, la Federación Internacional de Diabetes estimó, que a nivel mundial existen 382 millones de personas con este mal, de los cual el 46% no han sido diagnosticados.²

La hiperglicemia induce cambios metabólicos que alteran el equilibrio oxidativo, aumentando la formación de radicales libres provenientes principalmente del oxígeno.³

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) presentan un electrón desapareado muy reactivo en su orbital externo, lo que les da una configuración espacial inestable, confiriéndoles capacidad para iniciar una reacción en cadena con las moléculas vecinas, que produce daño en los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.^{3,4}

El estrés oxidativo asociado a la hiperglicemia estaría implicado en el desarrollo de complicaciones vasculares crónicas como: retinopatía, nefropatía y neuropatía típicas de pacientes con DM.^{5, 6}. El daño oxidativo de las EROs sobre los lípidos de membrana, conocido como lipoperoxidación, es el principal mecanismo causante del daño celular oxidativo. Se trata de una reacción en cadena de activación de ácidos grasos poliinsaturados, inducida por el radical hidroxilo en cuyo proceso se produce un metabolito final, conocido como malondialdehído (MDA), el cual es medido en suero como indicador de estrés oxidativo y daño celular.^{7, 8}



La célula posee varios mecanismos antioxidantes, cuyo objetivo es evitar o minimizar el daño provocado por los radicales libres^{4,9}; mecanismos antioxidantes que resultan insuficientes ante la hiperglicemia sostenida.^{3,5} Se ha demostrado que dietas saludables enriquecidas con antioxidantes no enzimáticos neutralizan el efecto oxidativo de los radicales libres.⁹

Raquel Oré *et al.* Demostraron la actividad antioxidante de la vitamina E en los niveles de lipoperoxidación sérica en ratas diabéticas y en ratas hipercolesterolémicas.^{10,11}

En el año 2013, Nascimento *et al.* Mediante ensayos *in vitro*; reporta que la planta *Plukenetia volubilis L.* (“Sacha inchi”) posee principios activos con propiedad antioxidante.¹² Propiedades que a la fecha no han sido demostradas *in vivo*. En el presente estudio se pretende determinar el efecto antilipoperoxidante de la administración del extracto de las hojas de *Plukenetia volubilis L.* (Sacha inchi) en ratas con diabetes inducida por aloxano. E incorporar las hojas de *Plukenetia volubilis* como tratamiento complementario que minimice el daño asociado al estrés oxidativo.



II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Objeto de Estudio:

La concentración de malondialdehído en suero de ratas con diabetes inducidas por aloxano, sometidas a tratamiento dietético en base a *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi).

2.2. Materiales:

Las hojas de *Plukenetia volubilis* L. fueron traídas de la ciudad de Juanjuí, provincia de Mariscal Cáceres, región San Martín. El ambiente y los reactivos utilizados fueron proporcionados por las facultades de Ciencias Biológicas y Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo

2.3. Muestra: La muestra estará constituida por especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman (ratas albinas) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

2.3.1. Criterios de inclusión: Especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman (ratas albinas) hiperglicémicos (concentración de glucosa sérica mayor o igual a 200 mg/dl), con 3 meses y medio de edad y peso corporal entre 290 ± 100 g.

2.3.2. Criterios de exclusión: Especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman (ratas albinas) muertos o que adquieran algún otro tipo de enfermedad adicional como efecto colateral de la inducción de diabetes por aloxano.



2.3.3. Tamaño muestral: Se utilizaron 28 especímenes de *Rattus norvegicus* con diabetes distribuidas en 4 grupos de 7 cada uno.

2.4. Proceso de captación de datos.

Se realizó un estudio de tipo experimental. La muestra de 36 especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman fue obtenida del bioterio del Instituto Nacional de Salud de Lima (ANEXO 1). Los especímenes llegaron a la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde se desarrolló el experimento.

2.4.1 Proceso de aclimatación:

Una vez adquiridos los especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman, se llevó a cabo el proceso de aclimatación durante 20 días. Durante este periodo fueron alojados en 8 jaulas cada una conteniendo entre 3 a 4 especímenes bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura ambiental de 22.5 ± 2.5 °C, con ciclo luz/oscuridad de 12 horas). Se administró a cada espécimen ración y agua *ad libitum*.

2.4.2 Inducción de diabetes:

Posterior a los 20 días de aclimatación, los especímenes no consumieron alimento alguno durante las 18 horas previas a la administración de aloxano, con la finalidad de eliminar el efecto protector sobre las células β de los islotes pancreáticos que ejercen algunos azúcares. Se procedió con la inducción de diabetes mediante la administración de aloxano por vía intraperitoneal (i.p.) a los 36 especímenes en una



dosis de 150 mg/kg con agua destilada al 5%. Una vez administrado el aloxano, se administró también una solución de glucosa al 20% durante las 6 – 12 horas siguientes con la finalidad de evitar la muerte por hipoglicemia marcada que se produce en ese periodo. Además se empezó con la administración de agua con sales de rehidratación oral a fin de compensar la pérdida de electrolitos.

2.4.3 Medición de glicemia:

Los pesos y niveles de glicemia fueron tomados 15 días después de la administración de aloxano (ANEXO 2.1), periodo en el cual fallecieron 8 especímenes (22.2%), probablemente producto de la acidosis generada por la diabetes. Para la medición de glicemia se obtuvieron muestras de sangre de la vena coccígea de cada uno de los 28 especímenes restantes de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman. La gota de sangre obtenida del ápice de la cola se colocó directamente en una tira reactiva para la determinación de glucosa.

Las concentraciones de glucosa se determinaron mediante el método conductivimétrico con un glucómetro digital Prestige fácil (NIPRO), y expresadas en miligramos/decilitro (mg/dl).

2.4.4 Aleatorización y selección de muestra:

De los 28 especímenes machos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman a los que se les administró aloxano, desarrollaron hiperglicemia (nivel de glicemia superior a 200 mg/dl) formaron parte del estudio y fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro (4) grupos: G₀: grupo control, G₀: grupo estándar, G₁: grupo con *Plukenetia volubilis* L. a 120mg/kg y G₂: grupo con *Plukenetia volubilis* L. a 140mg/kg.



2.4.5 Administración de *Plukenetia volubilis* y vitamina E:

El extracto fluido de la planta *Plukenetia volubilis* L. (Sacha Inchi) fue obtenido en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. El método de elaboración y el tamizaje fotoquímico utilizo como solvente alcohol al 10% (ANEXO 3 y 4).

Se conformaron 4 grupos con 7 especímenes cada uno, el grupo G0 recibió, 0.64 ml/kg de etanol al 10%, el grupo G1 recibió 100 UI de vitamina E por vía oral, el grupo G2 recibió 120 mg/kg del extracto de hojas de sachá Inchi y el grupo G3 recibió 140 mg/kg de sachá Inchi.

El experimento duro 15 días durante el cual los especímenes recibieron el producto por vía oral. Manteniendo una dieta estándar para todos los grupos a base de ratonina y sales de rehidratación oral al 1/3.

2.4.6 Extracción de las muestras de sangre

Finalizados los 15 días del experimento, los especímenes de *Rattus norvegicus* de G₀, G₁, G₂ y G₃ fueron pesados, posteriormente se les midió la glicemia (ANEXO 2.2) y permanecieron en ayuno 12 horas antes de la extracción de las muestras de sangre. Los especímenes fueron anestesiados con pentobarbital y mediante punción cardíaca se extrajeron 2 a 3 ml de sangre.

2.4.7 Determinación del malondialdehído (MDA)

El MDA sérico, fue medido con la técnica de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrita por Estepa⁷ y modificada por Roberto Ibañez.⁸ (ANEXO 5). 100 ul



de suero, se dejan reposar a 5°C, en oscuridad durante 60 minutos, luego se expone a ebullición con agua hirviendo por 60 minutos, se deja enfriar y centrifuga a 4000 RPM por 10 minutos, el sobrenadante es leído en el espectrofotómetro marca MILTON ROY Modelo: SPECTRONIC a 532 nm.

La concentración de MDA, se obtiene de la curva de calibración con las concentraciones estándar de MDA (ANEXO 6), y los resultados se expresan en nanomol por mililitro. (ANEXO 7)

2.5. Aspectos éticos:

Todos los animales de experimentación estuvieron bajo el régimen de acuerdo con el artículo décimo del apartado referente a la Experimentación e Investigación y la Docencia de la Ley de Protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio (Ley N° 27265). El cual estipula el respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento, antes de tomar la muestra sanguínea por punción cardiaca, fueron anestesiados con tiobarbital.

En el presente trabajo de investigación se empleó las consideraciones éticas de la experimentación animal de la Guía de Manejo y Cuidado de los Animales propuesta por el Ministerio de Salud del Perú con la finalidad de crear un ambiente adecuado y libre de peligros; así como una óptima calidad de vida. Que permitió que los 27 especímenes, sobrevivieran al experimento. y fueran cedidos finalmente a la facultad de farmacia.



2.6. Análisis de datos:

Para el análisis e interpretación de la información; primero se tabularon los datos de pesos y glicemias obtenidos en una hoja de trabajo en el programa Excel. Para los resultados de las concentraciones de MDA en los diferentes grupos (Tabla 1), se aplicó el método estadístico de Análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) entre los grupos G0, G1, G2 y G3 (Tabla 2). Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos (Tabla 3 y Figura 1). Luego, se calcularon las medias de los valores de pesos y glicemias de cada grupo al inicio y al final. Estos datos fueron evaluados mediante la prueba T student para muestras relacionadas pre y post de cada grupo (Tablas 4 y 5). Para todas estas pruebas se consideró una significancia de $p < 0,05$. Los programas utilizados para el análisis de las variables fueron Microsoft Excel 2010®, software SPSS 20®.



III. RESULTADOS

3.1 Concentraciones de malondialdehído (MDA) en suero de ratas con diabetes inducida por aloxano

Para el caso de las concentraciones séricas de malondialdehído de los especímenes de todos los grupos (G₀ - G₃), las medias y desviaciones estándar de cada grupo se encuentran registradas en la **TABLA 1**.

TABLA 1 CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MALONDIALDEHÍDO, SEGÚN GRUPO Y TRATAMIENTO (nanomol por mililitro)

Grupo	Tratamiento	Tamaño muestral	Media	Desviación estándar
G ₀	Ninguno a/	7	7,9823	0,30642
G ₁	Vitamina E	7	5,5800	0,71296
G ₂	<i>Plukenetia volubilis</i> L. b/ [120 mg/kg p.c.] c/	7	6,6904	0,59389
G ₃	<i>Plukenetia volubilis</i> L. b/ [140 mg/kg p.c.] c/	7	6,1053	0,73103
Total		28	6,5895	1,07774

a/ El grupo G₀ solo recibió agua *ad libitum* durante todo el proyecto.

b/ *Plukenetia volubilis* Lineo.

c/ Peso corporal

Fuente: Datos recolectados por los autores - Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

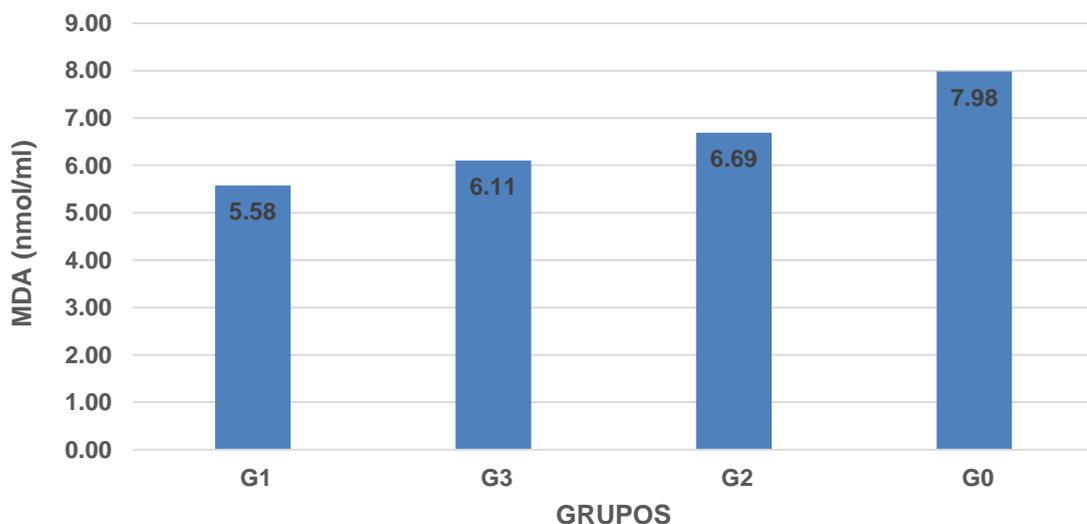
Estos resultados muestran que, en promedio, el grupo G₀ que no recibió tratamiento alguno posee la más alta concentración sérica de MDA (7,9823 nmol/ml); mientras que el grupo G₁, tratado con vitamina E, posee la más baja (5,5800 nmol/ml). Además, el grupo G₃ tratado con dosis de 140 mg/kg p.c. de *Plukenetia volubilis* L. muestra una media de concentración sérica de MDA menor que el grupo G₂ también tratado con *Plukenetia volubilis* L., pero con una dosis menor (120 mg/kg p.c.).



Con respecto a las desviaciones estándar de las concentraciones séricas de MDA, el grupo G₀ presenta la menor y el grupo G₁ la mayor, siendo estas 0,30642 y 0,71296 respectivamente.

En la **FIGURA 1** se ilustran y comparan las diferentes medias de concentración sérica de MDA de cada grupo (G₀, G₁, G₂ y G₃). El grupo G₁ muestra una concentración sérica de MDA media 30,10% menor que la del grupo control G₀; el grupo G₂, una concentración sérica de MDA media 16,18% menor que la del grupo control G₀; y el grupo G₃, una concentración sérica de MDA media 23,50% menor que la del grupo control G₀.

FIGURA 1 MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MALONDIALDEÍDO, SEGÚN GRUPO (nanomol por mililitro)



Fuente: Datos recolectados por los autores - Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.



Una vez registradas las medias y desviaciones estándar de las concentraciones séricas de MDA, se aplicó la prueba *análisis de la varianza (ANOVA)* de un factor para los cuatro grupos (G_0 , G_1 , G_2 y G_3) (TABLA 2); y se obtuvo un valor F de 20,08 y un valor para $p < 0,05$ de $9,9E-07$.

TABLA 2 CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MALONDIALDEHÍDO, SEGÚN GRUPO Y TRATAMIENTO

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F a/	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	22,42537 885	3	7,47512 6283	20,07660 485	9,91E -07	3,008786 6
Dentro de los grupos	8,935924 78	24	0,37233 0199			
Total	31,36130 363	27				

a/ Cociente de las varianzas “entre grupos” y “dentro de los grupos”.

Fuente: Datos procesador por los autores, Microsoft® Office Excel 2013 - Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Es evidente el rechazo de la hipótesis nula ($H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$) por ser el valor obtenido de F (20,08) significativamente mayor al valor crítico para F de 3,01. Además, se acepta la hipótesis alternativa (H_1) por la que al menos uno de los grupos tiene una media distinta del resto de grupos y por lo tanto las diferencias encontradas no pueden explicarse por el azar.



3.2 Comparación de los niveles séricos de lipoperoxidación en de *Rattus norvegicus* con diabetes inducida por aloxano

Posteriormente al análisis ANOVA, se aplicó la prueba del Rango Múltiple Duncan (*prueba de comparaciones múltiples*) y se encontró que por lo menos dos grupos muestran una diferencia significativa. Todos los grupos de tratamiento (G_1 , G_2 y G_3) muestran diferencia con respecto al grupo control (G_0) (TABLA 3).

TABLA 3 PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES (PRUEBA DE DUNCAN) ENTRE LOS GRUPOS G_0 , G_1 , G_2 Y G_3

Grupo	Tratamiento	Tamaño muestral	Grupo homogéneo para $\alpha = 0,05$		
			1	2	3
G_1	Vitamina E	7	5,5800		
G_3	<i>Plukenetia volubilis</i> L. a/ [140 mg/kg p.c.] b/	7	6,1053	6,1053	
G_2	<i>Plukenetia volubilis</i> L. a/ [120 mg/kg p.c.] b/	7		6,6904	
G_0	Ninguno a/	7			7,9823

a/ *Plukenetia volubilis* Lineo.

b/ Peso corporal

$p < 0,05$

Fuente: Datos recolectados por los autores - Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

Así mismo, se determinó que los niveles de lipoperoxidación resultaron significativos al comparar los grupos tratados con de vitamina E (G_1) y *Plukenetia volubilis* L. 120 mg/kg p. c. (G_2); pero no se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados con de vitamina E (G_1) y *Plukenetia volubilis* L. a la dosis de 140 mg/kg p.c. (G_3), ni entre los grupos tratados con *Plukenetia volubilis* L. a la dosis de 140 mg/kg p.c. y *Plukenetia volubilis* L. a la dosis de 120 mg/kg p.c. (TABLA 3).



IV. DISCUSIÓN

Dentro de las 2 semanas post-inducción de diabetes, fallecieron 8 especímenes (22.2%) probablemente producto de la acidosis generada por la diabetes. Sin embargo, esta cifra resultó menor comparado con Carvalho *et al*¹³ que reportaron el fallecimiento de 40 % de la muestra durante este periodo.

El tamizaje fitoquímico realizado de las hojas de la planta *Plukenetia volubilis L.* (Sacha Inchi), dio positivo para la presencia de moléculas con propiedades antioxidantes, tales como flavonoides (ensayo de Shinoda) y polifenoles (prueba de cloruro férrico). Esto corrobora los resultados obtenidos por Nascimento *et al*¹², determinando un porcentaje importante de estas moléculas dentro de las hojas de Sacha Inchi. El extracto fluido de *Plukenetia volubilis L.* permitió concentrar y conservar adecuadamente estas moléculas para su posterior administración.

El malondialdehído (MDA) es un indicador útil para determinar los niveles de lipoperoxidación. Los resultados presentados después de la administración de cada uno de los tratamientos, muestran una reducción significativa de los niveles de lipoperoxidación ($p < 0.05$) en los grupos de vitamina E (G1) y de Sacha Inchi (G2 y G3) en comparación con el control (G0). El grupo G1 de vitamina E redujo el MDA sérico en aproximadamente un 30% con respecto al grupo control, resultado similar al obtenido por Oré *et al* quienes dieron suplementación de vitamina E en ratas diabéticas, reduciendo la lipoperoxidación en un 25%. Las dosis de los grupos de tratamiento con Sacha Inchi se tomaron teniendo como base estudios previos de toxicidad por dosis máxima¹⁴. En cuanto al grupo G2 de Sacha Inchi con dosis de 120 mg/kg p. c., este mostró una reducción significativa de los niveles de MDA sérico, de aproximadamente



del 16.18% con respecto al control. En relación al grupo G3 de Sacha Inchi con dosis de 140 mg/kg p. c., como se esperó, también mostró una importante reducción de los niveles de MDA sérico en un 23.5% con respecto al grupo control, probablemente debido a la mayor cantidad importante de sustancias antioxidantes (flavonoides y polifenoles) presentes en dicho extracto. Además, se observó que no existían diferencias significativas entre los grupos de Sacha Inchi a mayor y menor dosis, y que el grupo de Sacha Inchi a mayor dosis no presentaba diferencia significativa con respecto al grupo de vitamina E, lo que muestra una gran eficacia del extracto en la reducción de la lipoperoxidación al ser comparada con este *gold standard*.

De forma global, se concluye que los tratamientos in vivo con el extracto de hojas de *Plukenetia volubilis L.* fueron eficaces en reducir los niveles de lipoperoxidación en suero de ratas. Sin embargo, los análisis llevados a cabo en suero sólo presentan un panorama general de lo que ocurre en el organismo, pero no de un órgano en particular, por lo que se plantea que para estudios posteriores se pueda evaluar la respuesta de estas terapias antioxidantes de manera específica en un órgano determinado, y de esa manera corroborar la efectividad de los tratamientos para evitar el daño por estrés oxidativo. Incluso, si bien es cierto los resultados apoyan el uso de esta planta como terapia complementaria en la diabetes, aún se espera mayores estudios preclínicos con animales de experimentación en este campo.



V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes Association. Diabetes Care January 2014 vol. 37 no. Supplement 1 S81-S90. doi: 10.2337/dc14-S081. Disponible en: http://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81.full
2. Aguiree F, Brown A, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas. 6th Edition. Disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas>
3. Céspedes Miranda Ela María, Riverón Forment Gretel, Alonso Rodríguez Celia, Cabrera Pérez-Sanz Elsa. Control glucémico y daño oxidativo a biomoléculas en diabéticos tipo 2. Rev Cubana Endocrinol [revista en la Internet]. 2014 Ago [citado 2015 Jun 10]; 25(2): 46-56. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-29532014000200002&script=sci_arttext
4. Anu Rahal, Amit Kumar, Vivek Singh, et al., "Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay," BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 761264, 19 pages, 2014. doi:10.1155/2014/761264 Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/761264/cta/>
5. Cade WT. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Physical Therapy*. 2008; 88(11):1322-1335. doi:10.2522/ptj.20080008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2579903/>
6. Michael J. Fowler, MD. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes, *Clinical Diabetes* 2008; 26: 77–82. Disponible en: <http://clinical.diabetesjournals.org/content/26/2/77.full>
7. Estepa V, Ródenas S, Martín MC. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal Real Acad Farm*. 2001; 67(3):1-17.
8. Ybañez R. Efecto del extracto crudo de *Lycopersicum esculentum* y su comparación con ácido acetilsalicílico en la lipoperoxidación inducida en membranas eritrocíticas humanas. Tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. 2005
9. Kabel, Ahmed M. "Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition." *World Journal of Nutrition and Health* 2.3 (2014): 35-38. Disponible en: <http://pubs.sciepub.com/jnh/2/3/2/>



- 10.R. Oré, R. Valdivieso y D Huerta. Capacidad antioxidante en ratas diabéticas rol de la vitamina E. Revista Peruana de Biología 2000; 7. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v07_n2/capaci_antioxi.htm
- 11.R. Oré, R. Valdivieso, I. Arnao y S. Suárez. Beneficios de la suplementación de vitamin E en ratas hipercolesterolémicas. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2001; 62: 7 -12. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v62_n1/Vitamina%20E.htm
- 12.Nascimento, A. K. L., Melo-Silveira, R. F., Dantas-Santos, N., Fernandes, J. M., Zucolotto, S. M., Rocha, H. A. O., & Scortecci, K. C. Research Article Antioxidant and Antiproliferative Activities of Leaf Extracts from Plukenetia volubilis Linneo (Euphorbiaceae). Evid-Based Complemt. Alternat. Med. (2013) Article ID 950272, 10 pages. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/950272/>
- 13.Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. Acta Cir Bras 2003 Vol18 Special Edition.
- 14.Castillo EF, Castillo SF, Reyes CE. Estudio fitoquímico de Plukenetia volubilis L. y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de Rattus rattus var. Albinus. Revistas Peruanas. [revista en la Internet]. Ene- Jun 2010; 2(1):11-21. [citado 2015 Abr 17]. Disponible en: <http://ojs.ucv.edu.pe/index.php/UCV-SCIENTIA/article/view/475>
- 15.Eder A. Hernández-Ruiz¹ , Jaime A. Castrillón-Estrada² , Juan G. Acosta-Vélez³. David F. Castrillón-Estrada⁴ . Diabetes Mellitus en el servicio de urgencias: manejo de las complicaciones agudas en adultos Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 2008; 24 (2): 273-293