



**Valoración del efecto lipolítico y antioxidante del extracto etanólico de las hojas
Bauhinia variegata Linn en un modelo experimental de diabetes inducida
*Caenorhabditis elegans***

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 2020



Valoración del efecto lipolítico y antioxidante del extracto etanólico de las hojas
***Bauhinia variegata* Linn en un modelo experimental de diabetes inducida**
Caenorhabditis elegans

Presentado por:

Yulieth Alejandra Castañeda Chávez

Daniela Alejandra Correales Molano

Asesora:

Ruth Mélida Sánchez Mora MSc.PhD.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 2020



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

BOGOTA D.C

2020

Valoración del efecto lipolítico y antioxidante del extracto etanólico de las hojas

***Bauhinia variegata* Linn en un modelo experimental de diabetes inducida**

Caenorhabditis elegans

Dedicatoria

Inicialmente agradezco a mi familia por motivarme a que sin importar cuantas veces en mi camino encontrara piedras debía superarlas y seguir levantándome para continuar, a mi mama por su apoyo, creer en mi en todo momento y permitirme cumplir esta meta, a mi abuela Nati por estar conmigo, por creer en mi y por ser mi apoyo a lo largo de mi carrera profesional, a mi papa por su apoyo, a mi abuelo, a mi tía, a mi hermano y a mi hijo que es mi motivo para seguir adelante y por el cual yo inicie un camino de aprendizaje y superación, a David por su apoyo en la etapa final de mi carrera y agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por todo el conocimiento que recibí y por permitirme realizar esta investigación.

Yulieth Alejandra Castañeda Chávez

Dedico este trabajo primeramente a mi familia, a mi Mami, a Lucho y a Nerón, porque de no ser por ellos seguramente no estaría en este momento donde estoy. Porque han sido el pilar más grande e importante en mi vida. Ellos merecen este logro como propio..

Daniela Alejandra Corrales Molano

Agradecimientos

Inicialmente agradezco a mi familia por motivarme a que sin importar cuantas veces en mi camino encontrara piedras debía superarlas y seguir levantándome para continuar, a mi mama por su apoyo, creer en mi en todo momento y permitirme cumplir esta meta, a mi abuela Nati por estar conmigo, por creer en mí y por ser mi apoyo a lo largo de mi carrera profesional, a mi papa por su apoyo, a mi abuelo, a mi tía Yaneth, a mi hermano y a mi hijo que es mi motivo para seguir adelante y por el cual yo inicie un camino de aprendizaje y superación, a David por su apoyo en la etapa final de mi carrera y agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por todo el conocimiento que recibí y por permitirme realizar esta investigación.

Yulieth Alejandra Castañeda Chávez

A mi madre primeramente, por su incondicional apoyo durante toda mi carrera, por enseñarme siempre que el que persevera alcanza, porque cada día tenía una palabra de apoyo para no rendirme durante todo este tiempo y más que nada porque ha sido la única que ha creído ciegamente en mí. A Lucho por que junto a mi madre y nerón son todo lo que tengo y quienes me han motivado a llegar hasta aquí.

A mi familia en especial a mis abuelos Yiyos, porque sin su apoyo y sus enseñanzas no estaría pasando por estos momentos. A Edwin por que junto a Alejandra lograron que yo saliera adelante aun con todos los problemas que se presentaron. Y a mí tío Helbert por siempre ser un apoyo para mi mami y para mí.

A mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a Sebastián Hernández, por ser la única persona que ha sabido aguantarme aun cuando ni yo lo hago, por saber siempre como levantarme y no dejarme caer. A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca porque me brindo las herramientas para poder culminar esta etapa, me permitió conocer

personas inigualables a lo largo de mi carrera y me dio la oportunidad de llevar mis conocimientos fuera del país; esto no hubiera sido posible sin mi asesora la Dra Ruth Melida Sánchez, que ha sido siempre un apoyo durante todo este proceso.

Daniela Alejandra Correales Molano

Tabla de contenido

Resumen.....	12
1. Introducción.....	13
2. Antecedentes.....	15
3. Marco referencial.....	21
3.1. Diabetes mellitus.....	21
3.2. Fisiología de la diabetes.....	22
3.2.1. Liberación y acción de la insulina.....	22
3.2.2. Transducción de señales del receptor a insulina.....	23
3.3. Fisiopatología de la diabetes.....	24
3.3.1. Diabetes tipo I.....	24
3.3.2. Diabetes tipo II.....	24
3.4. <i>Bauhinia variegata</i> y su uso medicinal.....	25
3.4.1. fitocompuestos presentes en las hojas de <i>Bauhinia variegata</i>	26
3.5. <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
3.5.1 Características fenotípicas y fisiológicas de la cepa N2 de <i>C. elegans</i>	27
3.5.2. <i>C. elegans</i> como modelo experimental de Diabetes inducido en el estudio de extractos naturales.	28
3.6. Estrés oxidativo	29
4. Diseño metodológico.	31
4.1. Tipo de investigación.....	31
4.2. Hipótesis, variables e indicadores.....	31
5. Técnicas y procedimientos.	31
5.1. Extracto etanólico.....	31
5.2. Identificación de fitocompuestos.....	32
5.2.1. Cromatografía de terpenos.....	33
5.2.2. Cromatografía de flavonoides.	33
5.3. Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico sobre la cepa <i>E. coli</i> OP50.....	33

5.4. Mantenimiento del nematodo.....	33
5.5. Caracterización fisiológica del nematodo.....	34
5.5.1. Ensayo de reproducción.....	34
5.5.2. Ensayo de longitud.....	34
5.5.3. Ensayo de movilidad.....	35
5.6. Tinción de lípidos.....	36
5.6.1. Tinción de azul de nilo.....	35
5.6.2. Tinción con sudan III.....	36
5.7. Ensayo de estrés oxidativo.....	36
5.8. Estadística.....	36
6. Resultados.....	37
6.1. Obtención del extracto etanólico de <i>Bauhinia variegata</i> Linn.....	37
6.2. Identificación de fitocompuestos presentes en el extracto de la planta.....	37
6.3. Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico sobre la cepa <i>E. coli</i> OP50.....	39
6.4. Diferenciación de los estadios larvarios de la cepa N2 salvaje bajo diferentes condiciones.....	39
6.5. Caracterización fisiológica de la cepa N2 salvaje bajo diferentes condiciones.....	41
6.5.1. Reproducción.....	41
6.5.2. Longitud.....	42
6.5.3. Movilidad.....	44
6.6. Tinción de lípidos.....	45
6.6.1. Tinción azul de Nilo.....	46
6.6.2. Tinción sudan III.....	47
6.7. Ensayo de estrés oxidativo.....	47
7. Discusión.....	48
8. Conclusiones.....	52
9. Anexos.....	53
10. Bibliografía.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Fitocompuestos presentes en el extracto de *Bauhinia variegata var Linn*
- Figura 2. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*
- Figura 3. Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*
- Figura 4. Esquema de los mecanismos que explica como la hiperglucemia contribuye al daño oxidativo
- Figura 5. Proceso para la obtencion del extracto etanolico
- Figura 6. Cromatografía de terpenos y flavonoides
- Figura 7. Diferenciacion de los estadios larvares del nematodo expuesto a diferentes condiciones
- Figura 8. Ensayo de Reproducción.
- Figura 9. Nematodos vistos al microscopio de reglilla.
- Figura 10. Ensayo de Longitud.
- Figura 11. Ensayo de Movilidad
- Figura 12. Tincion Sudan III
- Figura 13. Tincion Azul de Nilo
- Figura 14. Ensayo de Estrés oxidativo
- Figura 15. Modelo de diabetes.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Metabolitos secundarios por método de tubo.

Valoración del efecto lipolítico y antioxidante del extracto etanólico de las hojas
***Bauhinia variegata* Linn en un modelo experimental de diabetes inducida**
Caenorhabditis elegans

Resumen

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica metabólica de importancia mundial que se caracteriza por un estado de hiperglicemia causado por la pérdida absoluta o relativa de insulina. Esta patología afecta considerablemente el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y genera problemas a largo plazo que afectan órganos esenciales como el riñón, los ojos, el sistema vascular y el hígado entre otros, por lo que es urgente la búsqueda de tratamientos que logren disminuir las complicaciones crónicas o atenuar el desarrollo de la misma. Debido al abordaje sistémico de la diabetes, su estudio es bastante complejo. Esto ha llevado al uso de diferentes modelos experimentales animales como: ratones, conejos y algunos más pequeños como el *Caenorhabditis elegans*. El *C. elegans* representa un buen modelo de estudio de la diabetes debido a que presenta receptores de insulina similares en humanos denominados DAF-2 y DAF-16. Estos estudios en modelos animales han permitido determinar el efecto de algunas especies de plantas medicinales en este tipo de trastornos metabólicos como el de la diabetes.

En el presente estudio se utilizó el extracto etanólico de la planta *Bauhinia variegata* Linn, para evaluar su acción sobre el modelo experimental de diabetes inducido *C. elegans*. Para este fin, se indujo en el nematodo, un proceso de desregulación metabólica utilizando una concentración específica de glucosa en el medio NGM. A partir de allí, se evaluaron y compararon características fenotípicas y fisiológicas que se presentaron antes y después de la dieta rica en glucosa en diferentes pruebas, como lo son: prueba de motilidad, reproducción, longitud del cuerpo y estrés oxidativo (ROS), antes y después del tratamiento con el extracto etanólico, concluyendo que el extracto posee capacidad hipoglicemiante y antioxidante.

Palabras claves: Modelos experimentales, receptores, extracto, lipolítico, antioxidante, nematodo.

1. Introducción

Actualmente han ido en aumento los casos reportados de personas que padecen Diabetes Mellitus alrededor del mundo. Los tratamientos existentes para una persona que empieza a cursar con diabetes son por lo general hipoglucemiantes orales o insulina inyectable, que disminuyen la calidad de vida de las personas, además de generar dependencia de este tipo de medicamentos que a largo plazo tienen efectos secundarios en las personas.(1) Se plantea con el proyecto abrir nuevas posibilidades de tratamiento para las personas que padecen diabetes, partiendo de extractos de plantas medicinales que poseen efectos hipoglucemiantes, lipolíticos y antioxidantes, utilizando como modelo experimental el *C. elegans*, que demuestra ser una buena opción como primera instancia.

De todas las enfermedades que conocemos que acechan a los seres humanos, la Diabetes Mellitus afecta aproximadamente a 143 millones de personas en el mundo según la Organización mundial de la Salud, también la OMS dice que en el año 2030 habrá un aumento del 100% en la tasa de personas con diabetes. (2)

La diabetes mellitus (DM) se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, puesto que las personas que padecen la enfermedad han ido aumentando año tras año, la prevalencia de esta desregulación metabólica se debe mayormente a los malos hábitos alimenticios, sedentarismo y en menor porción por simple genética. Según la OMS los países de medianos y bajos ingresos, por lo general son los que sufren este tipo de enfermedad. (2) Se busca que a futuro existan diversos tratamientos para una persona que padezca DM, a base de plantas medicinales con efectos hipoglucémicos que mejoren de esta manera la vida de las personas que padecen la enfermedad, evitando en un tiempo el uso de medicamentos sintéticos como hipoglucemiantes orales o insulina intravenosa, que pueden producir efectos secundarios y la necesidad de incrementar las dosis a medida que pasa el tiempo.

El nematodo *C. elegans* ha sido de gran importancia en diferentes estudios en enfermedades predominantes en la sociedad tales como la diabetes y obesidad. (3) Se ha planteado como

modelo de investigación en diabetes el *C. elegans*, porque se ha reportado que sus vías de señalización de insulina son similares a las humanas y regulan en el nematodo tanto el metabolismo como la longevidad, y aunque este carezca de sistema vascular, comparte muchas similitudes a nivel molecular en los procesos patológicos que se encuentran en seres humanos. (4)

Por esta razón nace la necesidad de investigar más a fondo plantas que posean efectos hipoglucemiantes, que a futuro puedan ayudar a las personas a mejorar su calidad de vida aun teniendo esta enfermedad como lo es la diabetes.

Estudios anteriores han demostrado que existen plantas que se caracterizan por su reducido contenido calórico, de manera que constituyen una alternativa de dieta hipocalórica, recomendada para diabéticos, también se ha recomendado las hojas de *B. variegata Linn*, debido a la atribución de diferentes propiedades como son la regulación de la concentración de glucosa en sangre, la reducción del nivel de colesterol y el control de la presión arterial. (5).

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de las hojas de *B. variegata Linn* sobre la cepa N2 de *C. elegans* sometida a altas dosis de glucosas con el fin de evaluar los efectos del extracto etanólico de hojas de *B. variegata Linn* en longitud del cuerpo, reproducción y estrés oxidativo.

Por otro lado, se busca identificar si el uso de fitofármacos presentes en el extracto etanólico de las hojas de *B. variegata Linn*, logra contrarrestar el impacto mencionado anteriormente a causa de la inducción experimental de Diabetes en el nematodo. Como impacto indirecto, se busca que en un futuro se considere la posibilidad de realizar estudios con extractos, en modelos animales más grandes e ir escalando hasta el humano, para de esta manera contrarrestar los problemas de glucosa en sangre y así, ayudar a las personas que padecen de Diabetes Mellitus a mejorar su calidad de vida, evitando por un tiempo prolongado el uso de hipoglucemiantes sintéticos. Adicional a esto puede ayudar a avanzar en el estudio de plantas medicinales.

2. Antecedentes

A lo largo de los años, a medida que han ido surgiendo las diferentes patologías en los humanos, se ha tratado de buscar una forma de poder realizar estudios acerca de este tipo de trastornos por esto surgen los modelos animales que nos permiten llevar a cabo ensayos, en los que se estudie el funcionamiento de una enfermedad. Un modelo muy usado es el nematodo *C. elegans* el cual es bastante útil a la hora de realizar estudios de trastornos neurodegenerativos o como es el caso en trastornos metabólicos como lo es la diabetes. Uno de los primeros estudios realizados sobre el *C. elegans* se desarrolló en 1976 por Byerly y colaboradores (6), que describen por primera vez el ciclo de vida de la cepa salvaje de *C. elegans*, un nematodo que recientemente había sido descubierto como modelo para el estudio de diferentes trastornos, ellos en su laboratorio estandarizan la temperatura adecuada para la supervivencia del nematodo, ya que le proporciona las condiciones adecuadas para que se reproduzca y se desarrolle perfectamente, esto lo realizan basados en lo que escribió Brenner en 1974 sobre las diferencias entre el crecimiento y reproducción de las cepas salvajes y las cepas que tenían algún tipo de mutación.

Otros estudios no tan recientes, se realizaron en el año 1997, donde Ogg y colaboradores (7) hablan sobre el DAF 16 en el nematodo; en *C. elegans* se ha demostrado que se presentan dos homólogos al IGF-1 humano, que en este caso son el DAF-2 y el DAF-16, en este hacen un especial énfasis en el DAF-16 ya que es un factor que traduce la insulina y está presente en la regulación de transcripción de genes clave de control metabólico y de desarrollo. Por medio de sus estudios comprobaron que gracias al DAF-16, el nematodo cuando entra a una fase dauer crea una acumulación de lípidos más amplia que un nematodo en estadio L3 o L4. Las mutaciones en DAF-2, DAF-16 o DAF-7 se puede apreciar por medio de tinciones específicas para lípidos.

Por otro lado, en este mismo año, Koutarou y colaboradores (8), realizaron un estudio donde encontraron que un receptor de insulina como lo es el DAF-2 se ve involucrado en la regulación de la longevidad en el nematodo *C. elegans*. DAF-2, un gen clave en la vía genética que media esta señalización endocrina, codifica a un miembro de la familia del receptor de insulina. Las disminuciones en la señalización de DAF-2 inducen el metabolismo y cambios en el desarrollo, como en el control metabólico de los mamíferos

por el receptor de insulina. De este estudio cabe destacar la similitud en genes que presenta el *C. elegans* frente a los mamíferos, es por esta razón que el receptor DAF- 2 actuando en el hipodermo y en el intestino del nematodo es capaz de generar cambios en el metabolismo y afectar su longevidad y su capacidad de entrar en estadio dauer.

Es importante destacar también estudios en los que se han venido usando plantas medicinales, en el presente trabajo se estudió una en específico llamada *B. variegata Linn*, un árbol comúnmente encontrado en los bosques tropicales de América Latina y en Asia. Para el 2006, Parekh y colaboradores (9) realizaron un estudio sobre la planta *B. variegata Linn*, donde buscaban evaluar su capacidad antibacteriana y realizar un análisis de los compuestos presentes en la planta. Para evaluar la capacidad antibacteriana del extracto se utilizaron cepas ATCC de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Se realizó un extracto usando una serie de solventes como metanol, dioxano, acetona y DMF. A partir de este se realizó un estudio preliminar de los componentes de la planta buscando principalmente taninos, alcaloides, saponinas esteroides y glucósidos. Se demostró que la planta tenía una capacidad antibacteriana y que era más potente cuando el extracto era realizado con solventes como metanol y acetona.

En el año 2009 Schlotterer y colaboradores (10) realizaron un estudio cuyo objetivo fue tomar al *C. elegans* como un modelo para evaluar la toxicidad de la glucosa en cuanto a la reducción de la esperanza de vida del nematodo. Con el estudio se permitió llevar al nematodo a condiciones altas de glucosa y se midió por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno ROS y por medio de glioxalasa-1. Con este estudio se demostró el uso de *C. elegans* como modelo para el estudio de la toxicidad de la glucosa, donde los altos contenidos de glucosa limitan la esperanza de vida e incrementan la formación de ROS.

Siguiendo por la línea de la planta *B. variegata Linn*, para el año 2010, Barragan y colaboradores (11) llevaron a cabo un trabajo donde recolectaron, identificaron y caracterizaron a cuatro especies del género *Bauhinia* en una zona urbana de Ibagué. Adicionalmente realizaron una cuantificación de la cantidad de fenoles, flavonoides y

flavonoides totales. Los resultados de estos ensayos permiten evidenciar las diferencias entre dos especies de *Bauhinia* que son la *B. variegata* y la *B. pieta*, que se caracterizan por sus altos contenidos de fenoles y flavonoides totales que llevan a pensar que su gran acción antioxidante es debido a los fitocompuestos allí presentes. Años más adelante, para el año 2011 en la universidad de caldas en Manizales, Colombia, Martínez M. y sus colaboradores (12), llevaron a cabo el trabajo donde se probó la actividad antibacteriana y citotóxica in vivo de extractos alcaloidales de *B. variegata*. Los ensayos se llevaron a cabo sobre "camarones de mar" llamados *Artemia salina* y el potencial antibacterial se probó sobre *E. coli* por medio de difusión en disco. Se demostró que la actividad citotóxica se debía al efecto sinérgico del conjunto de los metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse y a los cuales se les atribuye esta actividad.

En el año 2013 Mishra A y colaboradores (13), realizaron un trabajo sobre el efecto antibacterial, antioxidante y anticancerígeno de extractos de hojas de *B. variegata*, se pudo observar que la antraquinona y las saponinas estaban presentes en extractos polares, mientras que los terpenoides y alcaloides lo estaban en extractos no polares y de etanol. En los ensayos de difusión en disco, las fracciones de éter de petróleo y cloroformo exhibieron una inhibición considerable contra *Klebsiella pneumoniae*. Varios otros extractos también mostraron actividad antibacteriana contra cepas patógenas de *E. coli*, *Proteus spp.* y *Pseudomonas spp.*

Para este mismo año se venían realizando también estudios sobre *C. elegans*, entre estos, Pino E. y colaboradores (14) hicieron un ensayo donde usaban el microscopio como herramienta fundamental a la hora de observar lípidos, en este caso, tomaron dos tinciones para poder comparar la cantidad de lípidos presentes en *C. elegans*. Se compararon la tinción de Nile red y la tinción Oil red O, se demostró que son tinciones específicas para poder ver acúmulos de grasa que se encuentran en el nematodo y que requieren de microscopio para poder observarlos.

En este trabajo se buscó tomar un modelo como el nematodo *C. elegans* y llevarlo a un estado diabético, para que, por medio de este, evaluar un trastorno metabólico como lo es la diabetes y a su vez usar una planta medicinal *B. variegata Linn* para contrarrestar este tipo de daños que causaron los altos niveles de glucosa en el nematodo. Como antecedentes, en el año 2014, Martínez N. y colaboradores (15), realizan una investigación para comprobar el efecto hipoglucemiante de un fitofármaco (DIAMET) que contiene las siguientes plantas: Cudeamor (*Momórdica charantia*), Pata de vaca (*B. forficata Link*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus Labil*) y Achiote (*Bixa orellana L.*), en medios que contienen células sanguíneas humanas y glucosa. Se realizaron los ensayos in vitro con el contenido del fitofármaco disuelto en solución salina al 0.9% en medios normoglucémicos, evidenciándose el efecto hipoglicemiante, al producir un descenso en las concentraciones de glucosa con respecto al control a las diferentes cantidades de la solución acuosa del fitofármaco añadidas al medio. Se evidenció que el valor P fue menor de 0,05 lo que permite sugerir que las probabilidades de que estos resultados hayan sido obtenidos al azar son mínimas, demostrando que el fitofármaco produjo un efecto hipoglucemiante estadísticamente significativo, y que a mayor concentración e intervalo de tiempo dicho efecto aumenta. Para este mismo año 2014, Moreno E. y colaboradores (15), hacen un estudio sobre *C. elegans*, donde lo usan como un modelo para el estudio de desórdenes metabólicos donde el estrés oxidativo contribuye como un factor importante. *C. elegans* es un poderoso organismo modelo que es invaluable para la investigación experimental porque puede usarse para recapitular la mayoría de las enfermedades humanas a nivel metabólico o genético in vivo. Este organismo contiene muchos componentes clave los cuales están relacionados con las redes de estrés metabólico y oxidativo que posiblemente podrían permitirnos aumentar e integrar información para comprender las causas y los mecanismos de las enfermedades complejas. El estrés oxidativo es un factor etiológico que influye en numerosas enfermedades humanas, incluida la diabetes. *C. elegans* muestra bases moleculares y vías celulares notablemente similares a las de mamíferos.

En este mismo año, se llevaron estudios donde probaban extractos de plantas en enfermedades del metabolismo en *C. elegans*, entre estos, Fitzenberg E. y colaboradores (16) hacen un ensayo donde usan extractos de plantas un total de 16 extractos utilizados en nutrición humana, para mejorar las actividades de supervivencia en el nematodo *C. elegans*.

Los nematodos fueron expuestos durante 48 hrs a 10 mM de glucosa en ausencia o presencia de extracto al 0.1%. A partir de entonces, la supervivencia fue medida a 37 ° C. Los extractos hechos de café, kola, rooibos y canela, no influyeron en la reducción inducida por glucosa y la reducción de la supervivencia. Los que estaban hechos de ginseng, manzanilla, lima flor, té de paraguay, bálsamo, rodiola, té negro o nudos, todos extendieron la vida útil de los nematodos tratados con glucosa significativamente, pero no rescató la supervivencia por completo. Los extractos de las hojas de moras, hibiscos, bayas de saúco o jiaogulan contrarrestaron completamente la supervivencia inducida por glucosa. Se presentó un modelo animal simple para detectar extractos de plantas con potencial para revertir la toxicidad de la glucosa.

El estudio de la diabetes ha sido muy importante ya que ha sido una enfermedad de gran impacto a nivel de salud pública, es por esto que día a día salen estudios donde se busca tratar la diabetes por medio de diferentes plantas medicinales. Para el año 2015, Luri de Franca Bonilha (17), realizó un estudio sobre como el potencial biológico de plantas del género *Bauhinia*, en su investigación se dieron cuenta que el género *Bauhinia* consta de aproximadamente 300 especies, que se conocen comúnmente como "pata de vaca" o "pezuña de vaca, debido a la forma de sus hojas. Están ampliamente distribuidos en la mayoría de los países tropicales, incluyendo África, Asia y América del Sur. Sus hojas y el tallo de corteza se utilizan con frecuencia en la medicina popular como un remedio para diferentes tipos de enfermedades, en particular la diabetes, infecciones, dolor y en los procesos inflamatorios. Los flavonoides de *Bauhinia longifolia* demostraron la mayor actividad antiviral de todas las sustancias analizadas, y siendo la quercetina la de mayor actividad antiviral entre los flavonoides purificados. El objetivo de esta revisión fue resumir los trabajos publicados en los últimos cinco años sobre la actividad biológica y la composición fitoquímica de las plantas del género *Bauhinia*. Para ello, se realizó una búsqueda en algunas de las bases de datos en la web como PubMed, Google Scholar y Medline, usando las palabras clave *Bauhinia*, actividad biológica, diabetes, cáncer.

En el año 2015, Jobson M. A y colaboradores (18), hicieron un trabajo acerca de los efectos transgeneracionales de la inanición temprana en el crecimiento, la reproducción y la resistencia al estrés en *C. elegans*. En el trabajo, hablan sobre la inanición durante el desarrollo temprano y como esta puede tener efectos duraderos que influyen en la aptitud del organismo y el riesgo de enfermedad. Caracterizaron las consecuencias fenotípicas a largo plazo del hambre durante el desarrollo larvario temprano en *C. elegans* para determinar la aptitud física potencial efectos y desarrollarlo como modelo para estudios mecanicistas. Durante este mismo año 2015, Michael Witting y Philippe Schmitt (19) usan al *C. elegans* como lipidoma y el análisis de lípidos en *C. elegans*. Allí mencionan que los lípidos juegan un papel importante en la biología, desde los componentes básicos de las membranas hasta los lípidos de señalización. El nematodo y el organismo modelo *C. elegans* se ha utilizado para explorar el metabolismo de los lípidos y Se han empleado varias técnicas para su análisis.

Para el año 2017, Jennifer L. Watts y colaboradores (20) hicieron un ensayo, donde miraron el metabolismo de lípidos y carbohidratos que son procesos altamente conservados que afectan a casi todos los aspectos de la biología organismal. *C. elegans* come bacterias, que consisten en lípidos, carbohidratos y proteínas que se descomponen durante la digestión en ácidos grasos, azúcares simples y precursores de aminoácidos. Con estos nutrientes, *C. elegans* sintetiza una amplia gama de metabolitos que son requerido para el desarrollo y el comportamiento. En esta revisión, se describen las estructuras de lípidos y carbohidratos, así como la biosíntesis y vías de descomposición que se han caracterizado en *C. elegans*.

En el año 2018, Jonathan Alcantar y colaboradores (21), realizaron un trabajo, donde sometieron al nematodo a dietas altas de glucosa y observaban cómo era la respuesta de los factores de transcripción del nemátodo. Se ha demostrado que estas dietas acortan la vida útil de *C. elegans*, eso depende de la señalización de insulina, pero la participación de otras vías de señalización tiene no se ha abordado. En este estudio, se determinó que los gusanos alimentados con dietas con altas concentraciones de glucosa muestran alteraciones en el contenido y la captación de glucosa, el contenido de triglicéridos, el tamaño corporal, la

cantidad de huevos puestos, defectos de puesta de huevos y signos de estrés oxidativo y envejecimiento acelerado.

Además, se analizó la participación de diferentes reguladores clave de carbohidratos y metabolismo lipídico, estrés oxidativo y longevidad como SKN-1 / NRF2, HIF-1 / HIF1 α , SBP-1 /SREBP, CRH-1 / CREB, CEP-1 / p53 y DAF-16 / FOXO, en la reducción de la vida útil de los nematodos alimentados con glucosa.

En el 2019, Ashwani Kumar y colaboradores (22), hicieron un estudio sobre la evaluación del efecto antioxidante de extractos etanólicos de la planta *B. variegata Linn*, en este trabajo usaron *B. variegata Linn* polvo de la corteza, se quitaron los excedentes de grasa con éter de petróleo. El material vegetal no desgrasado así como el material vegetal desgrasado era luego se extrajo individualmente en diferentes solventes con polaridad creciente verbigracia. 1,4-dioxano, acetona, metanol, dimetilformamida (DMF) y agua destilada respectivamente. La actividad antibacteriana de todos los extractos (no desgrasados y desgrasados) de *B. variegata Linn* de la corteza se determinó mediante el método de difusión de pozos de agar en tres diferentes concentraciones, es decir, 10 mg / ml, 5 mg / ml y 2,5 mg / ml.. La actividad antimicrobiana de los extractos desgrasados de *B. variegata Linn* fue mayor que sin desgrasar, ya que la actividad máxima se observó en la más alta concentración, es decir, 10 mg / ml. Extractos de acetona y metanol desgrasados de *B. variegata Linn* fueron más activos en comparación con otros extractos contra todos los organismos estudiados.

3. Marco referencial

3.1 Diabetes Mellitus

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) denomina Diabetes Mellitus (DM) a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia (Glucosa alta en sangre). Que es consecuencia de defectos en la secreción de insulina, su producción, en su acción, o en las todas las anteriores. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daño a largo plazo en diferentes órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. (23)

Existen varios tipos de Diabetes, entre los más comunes se encuentra la Diabetes tipo 1 (DM1), Diabetes tipo 2 (DM2) y la Diabetes gestacional (DG). La DM1 es causada por la destrucción de las células beta del páncreas por autoanticuerpos, lo que genera un déficit absoluto de insulina. La DM2 es causada por un proceso de resistencia en los receptores de las células a la insulina que va generando un déficit progresivo de su secreción. La DG se presenta cuando se diagnostica en el segundo o tercer trimestre del embarazo, sin que la mujer tenga antecedentes de DM. (23)

3.2. Fisiología

Entre los factores que conllevan a la aparición de DM está la deficiencia de insulina, ya sea por la falla en el funcionamiento o por la disminución de las células beta del páncreas, a lo que se le suma el incremento en la resistencia a la insulina manifestada por una mayor producción hepática de glucosa, particularmente musculo esquelético y tejido adiposo. En los últimos años se sabe que en la fisiopatología de la enfermedad están implicados otros procesos que involucran diferentes órganos, actualmente se conocen 8 mecanismos responsables de la aparición de DM2 (denominado octeto ominoso), así se ha postulado que el microbiota intestinal y los productos generados por esta pueden jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas. (24)

3.2.1. Liberación y acción de la insulina

La liberación eficiente de la insulina es un proceso indispensable en la homeostasis del cuerpo como respuesta al aporte energético del consumo diario de alimentos. Su liberación se ve inducida como respuesta al incremento de glucemia; (la glucosa, los aminoácidos, ácidos grasos y los cuerpos cetónicos) favorecen la secreción de insulina, también está mediada por la activación del receptor β 2-adrenérgico y la estimulación del nervio vago, mientras que los receptores alfa-adrenérgicos inhiben la liberación de insulina. (24)

La despolarización de la célula beta provoca la liberación de insulina, el proceso metabólico inicia con el aumento de la concentración plasmática de carbohidratos: la fructosa y la glucosa ingresan a las células beta por el transportador de glucosa (GLUT2), este es un transportador de glucosa con baja afinidad que se expresa en el hígado, riñón, células beta del páncreas y en la membrana de las células basales del intestino. Este

transportador sólo permite la entrada de glucosa cuando la concentración plasmática alcanza su umbral (>70 mg/dL), y en respuesta induce la liberación de insulina en la cantidad requerida para mantener la concentración de glucosa. (25)

A su vez el hígado es capaz de incorporar glucosa a través de su transportador GLUT2 para convertirla en glucógeno (polímero de carbohidratos) como almacenamiento de glucosa, que será degradado en un periodo postprandial tardío, y de esta manera mantener los valores fisiológicos de glucemia, por lo anterior se entiende que GLUT2, es un transportador bidireccional que puede transportar glucosa de sangre a tejido y viceversa. Tras el ingreso de la glucosa al interior de la célula beta mediante el GLUT2, se fosforila a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por la glucocinasa, esto determina la velocidad de glucólisis y de los procesos oxidativos que desencadenan en un incremento de ATP/ADP del citosol. Finalmente, la despolarización de la célula ocurre a causa del cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP), incrementando el potencial de membrana hasta alcanzar la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. La entrada de Ca^{2+} citosólico induce la fusión de la vesícula exocítica que contiene insulina con la membrana plasmática, permitiendo de esta manera la salida de insulina de las células beta del páncreas. (25)

3.2.2 Transducción de señales del receptor a insulina

La insulina es miembro de la familia de péptidos llamada factores de crecimiento insulinoides (IGF). El IGF-1 o somatomedina es un mediador de la hormona del crecimiento; los receptores de insulina y de IGF-1 tienen una relación tan estrecha que la insulina puede unirse con baja afinidad al receptor de IGF-1 y viceversa. El receptor de insulina está presente en todas las células de los mamíferos, tiene actividad tirosinacinasas intrínseca y está conformado por dos subunidades α y dos β . Las subunidades α son extracelulares y tienen el sitio de unión a ligando, mientras que las subunidades β son hidrofóbicas y atraviesan la membrana, tienen un dominio con varios residuos de tirosina, un dominio tirosina cinasa y un sitio de unión a ATP. Cuando se une la insulina al receptor, la subunidad α influye en la β para accionar la tirosina cinasa, se autofosforila en residuos de tirosina, y esto inicia la actividad de cinasa contra otras proteínas como los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 a 4), que junto con la proteína Shc participan como proteínas de andamiaje para otras. El receptor de insulina se internaliza inmediatamente después de la

unión con insulina, lo que puede llevar a su degradación o reciclaje. La actividad de la tirosina cinasa disminuye por el AMPc o la fosforilación de residuos de serina/ treonina en la subunidad β ; con frecuencia, la PKC y la PKA fosforila los residuos serina/treonina del receptor para finalizar la señalización, pero esta modificación postraducciona puede producir insulinoresistencia inducida por la secreción excesiva de catecolaminas en situaciones adversas; además, las diversas cinasas serina/treonina también fosforilan los IRSs como mecanismo de retroalimentación negativa del receptor a insulina.⁸ La mutación en el sitio del ATP o el reemplazo de los residuos de tirosina en el receptor de insulina produce su desensibilización a pesar de la unión de la insulina. (24)

3.3 Fisiopatología de la Diabetes

3.3.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1, también conocida como diabetes insulino dependiente, inicia comúnmente desde la infancia y se considera una enfermedad inflamatoria crónica causada por la destrucción específica de las células β en los islotes de Langerhans del páncreas. Como se mencionó anteriormente, estas células tienen como función primordial la secreción de insulina en respuesta al incremento en la glucemia. Existen distintas causas por las cuales puede ocurrir la destrucción de los islotes: virus, agentes químicos, autoinmunidad cruzada o, incluso, una predisposición genética. (23, 24)

Durante la etapa previa al inicio de la diabetes tipo 1, en el 80% de los individuos se detectan anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos o membranales de las células β pancreáticas como la descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 67 (GAD65 y 67), la proteína de choque térmico 65 (Hsp-65), y contra insulina.¹⁵ Sin embargo, la mayor susceptibilidad para desarrollar diabetes tipo 1 se encuentra en los genes del antígeno leucocitario humano (HLA clase II) del cromosoma 6, que contribuyen con el 50% del riesgo, y son asociados algunos polimorfismos genéticos en los sitios de unión del péptido (25)

3.3.2 Diabetes tipo 2

La obesidad mórbida se asocia con el desarrollo de diferentes enfermedades, entre las que destacan la diabetes y la hipertensión. La obesidad es una consecuencia de la ingesta continua y desregulada de alimento rico en contenido energético que no es aprovechado

como consecuencia de una baja actividad metabólica y/o sedentarismo, por lo tanto, se almacena y acumula en tejido graso. Durante esta situación, 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 niveles normales. (26)

Las causas que desencadenan la diabetes tipo 2 se desconocen en el 70-85% de los pacientes; al parecer, influyen diversos factores como la herencia poligénica (en la que participa un número indeterminado de genes), junto con factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, historia familiar de diabetes, dieta rica en carbohidratos, factores hormonales y una vida sedentaria. Los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos. Del 80 al 90% de las personas tienen células β sanas con capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina (obesidad, embarazo y cortisol) mediante el incremento en su función secretora y en la masa celular. Sin embargo, en el 10 al 20% de las personas se presenta una deficiencia de las células β en adaptarse, lo cual produce un agotamiento celular, con reducción en la liberación y almacenamiento de insulina. (25, 26)

3.4 *Bauhinia variegata* Linn y su uso medicinal

B. variegata Linn (pata de vaca), una especie de planta con flores perteneciente a la familia Leguminosae, (38) ha sido cultivada durante mucho tiempo como un árbol ornamental en Hong Kong. Es una de las tres especies de árboles *Bauhinia* comunes en Hong Kong, las otras dos son *B. purpurea* (pie de camello morado) y *B. blakeana* Dunn (el árbol de orquídeas de Hong Kong). (39) Los estudios sobre las variedades de *B. variegata* han indicado que se pueden purificar varios componentes medicinales de la planta. Su tallo muestra actividades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales, mientras que sus raíces tienen actividad antiinflamatoria. (40) Como las semillas de leguminosas generalmente tienen un alto contenido de inhibidores de la serina proteasa, no es sorprendente que se hayan identificado inhibidores de la serina proteasa en diferentes variedades de *B. variegata*. (27, 41)

3.4.1 Fitocompuestos presentes en las hojas de *B. variegata* Linn.

B. variegata Linn o pata de vaca, posee diversos fitocompuestos como flavonoides, saponinas, taninos, esteroides y triterpenos; que le otorgan a la planta distintas actividades como antibacterianas, antioxidantes, hipoglucemiantes y antifúngica. (28, 29, 43).

Prueba efectuada	Resultado	
Alcaloides	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-
	Hager	-
Flavonoides	Shinoda	+++
	HCl al 10%	+++
Nafto y/o antraquinonas	Borntrager-Kraus	-
Taninos	Gelatina Sal	+
	FeCl ₃	+++
Saponinas	Espuma	+++
Esteroides y/o triterpenoides	CCD Libermann-Burchard	-

Figura 1. Fitocompuestos presentes en el extracto de *B. variegata* var *linn* Antibacterial activity, determination of total polyphenols by Folin-Ciocalteu and toxicity in *Artemia* salina of plant species *B. variegata* Linn. (42)

3.5 *Caenorhabditis elegans*

Es un pequeño nematodo de vida libre que se encuentra en todo el mundo. *C. elegans* a lo largo de los años se ha convertido en un modelo biológico experimental excelente, que hoy en día es usado alrededor del mundo para diversos estudios, ya que cuenta con un sistema nervioso simple compuesto por 302 neuronas. (30, 46) Así como también un ciclo de vida corto, lo que facilita la obtención de resultados (Figura 2), de esta manera el tiempo de desarrollo de huevo a larva L1 es de 9 horas aproximadamente, seguido por el estadio L1 a L2 que tiene un tiempo de 12 horas, de L2 a L3 y de L3 a L4, cuenta con 8 horas aproximadamente entre cada uno; finalizando L4 a larva adulta puede transcurrir alrededor de 10 horas. Esta larva es capaz de mantener un sistema reproductor maduro y funcional durante 8 horas. Adicionalmente su vida útil es de 2 a 3 semanas, lo que facilita su estudio. (30, 47)

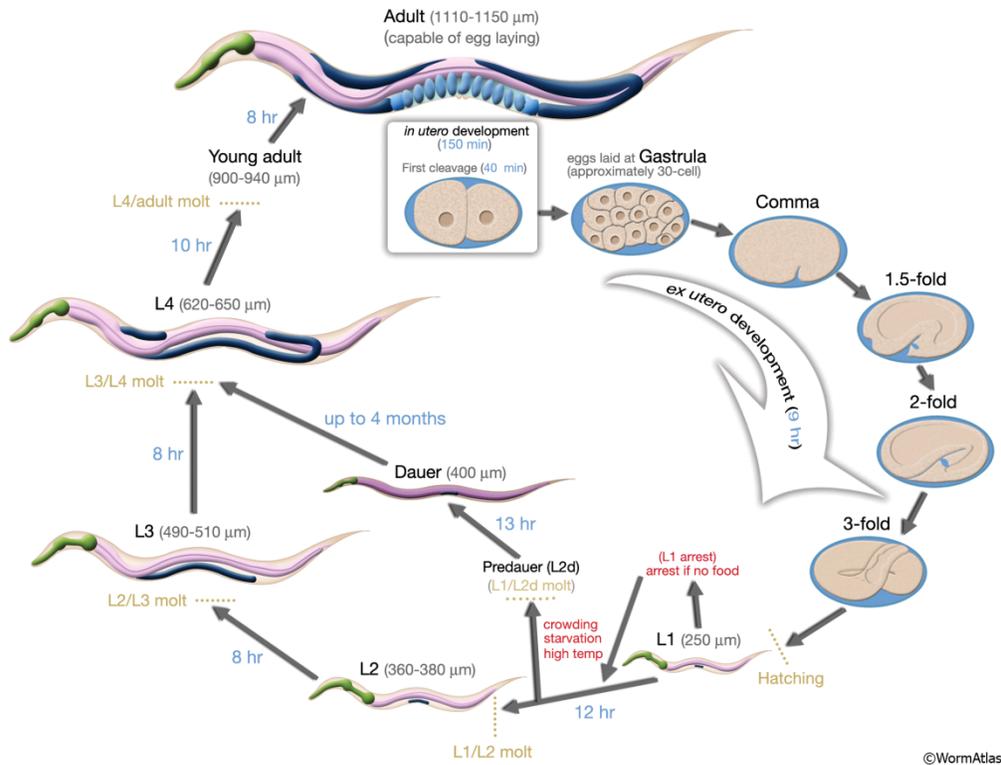


Figura 2. Ciclo de vida de *C. elegans*. Como el tiempo 0 se toma la fertilización. Los números que se observan en la imagen en color azul a lo largo de las flechas indican el tiempo que utiliza el nematodo para pasar a cada estadio larvario. La primera escisión se produce aproximadamente 40 minutos después de la fertilización. Los huevos son depositados afuera 150 minutos después de dicha fertilización y durante la etapa gástrula. La longitud del nematodo en cada estadio se encuentra junto al nombre en micrómetros.(4)

C. elegans tiene un impacto positivo a la hora de realizar distintas investigaciones puesto que es transparente, y las células individuales y los detalles subcelulares se visualizan fácilmente, debido a esto se pueden usar colorante o mediante el uso de proteínas fluorescentes se pueden etiquetar, receptores, neuronas o compartimentos celulares internos del nematodo. Todas estas características han ayudado a hacer del nematodo un poderoso modelo de elección para estudios de metabolismo y neuronales, ya que cuenta con un número invariable de células somáticas se ha podido generar un linaje celular completo. (30, 47)

3.5.1 Características fenotípicas y fisiológicas de la cepa N2 de *C. elegans*

Longitud de la cepa N2 *C. elegans*

El nematodo posee una longitud aproximada de $1100\pm 50\mu\text{m}$ hasta el final de su periodo fértil, las larvas recién eclosionadas tienen $250\mu\text{m}$ de largo, las larvas L2 miden aproximadamente entre $360 - 380\mu\text{m}$, larvas L3 entre $490 - 510\mu\text{m}$, larva Dauer $400\mu\text{m}$, larva L4 tiene una longitud entre $620 - 650\mu\text{m}$ y la joven adulta mide entre $900 - 940\mu\text{m}$, por su pequeño tamaño se observan en estereoscopio o microscopio compuesto. (31)

Reproducción de la cepa N2 *C. elegans*

El nematodo en condiciones normales produce entre 200 – 300 huevos en su etapa reproductiva, esto varía dependiendo las condiciones ambientales, alimenticias, en la calidad de vida y el estrés al que es sometido el nematodo. (32)

Motilidad de la cepa N2 *C. elegans*

Este se mide en la cantidad de ondas en forma de “S” en el nematodo en un tiempo de 30 seg, la cepa N2 o salvaje en condiciones normales presenta un promedio de 15 ondas en los 30 seg, igualmente varía según las condiciones a las que se expone la larva. (32)

3.5.2 *C. elegans* como modelo experimental de Diabetes inducido en el estudio de extractos naturales

Por su similitud en un 90% en la vía IIS de *C. elegans* respecto a la vía de señalización de la insulina humana, varias investigaciones de síndrome metabólico y Diabetes Mellitus se han realizado en *C. elegans*; esto provocó que se realizara una descripción y comparación de las dos vías que se muestra a continuación.

Los componentes principales de la vía IIS de *C. elegans* incluyen péptidos similares a la insulina (ILP), al menos uno de los cuales puede unirse y activar el receptor de insulina humana. La activación de DAF-2 / IGFR da como resultado el reclutamiento y la activación de la fosfoinositida 3-quinasa AGE-1 / PI3K. A su vez, las serinas / treonina quinasas PDK-1, AKT-1 y AKT-2 se activan, lo que resulta en la fosforilación del factor de transcripción DAF-16 / FoxO. La fosforilación de DAF-16 / FoxO regula sus interacciones con las proteínas 14-3-3 PAR-5 y FTT-2, que controlan la localización subcelular de DAF-16 / FoxO. La DAF-18 / PTEN lípido fosfatasa y la serina / treonina fosfatasa PPTR-1 / PP2A contrarrestan la señalización de AGE-1 / PI3K y AKT-1, respectivamente. DAF-16 / FoxO

interactúa con factores adicionales en el núcleo, incluidos SIR-2.1 y HCF-1, así como factores de transcripción adicionales, como HSF-1 y SKN-1. (4)

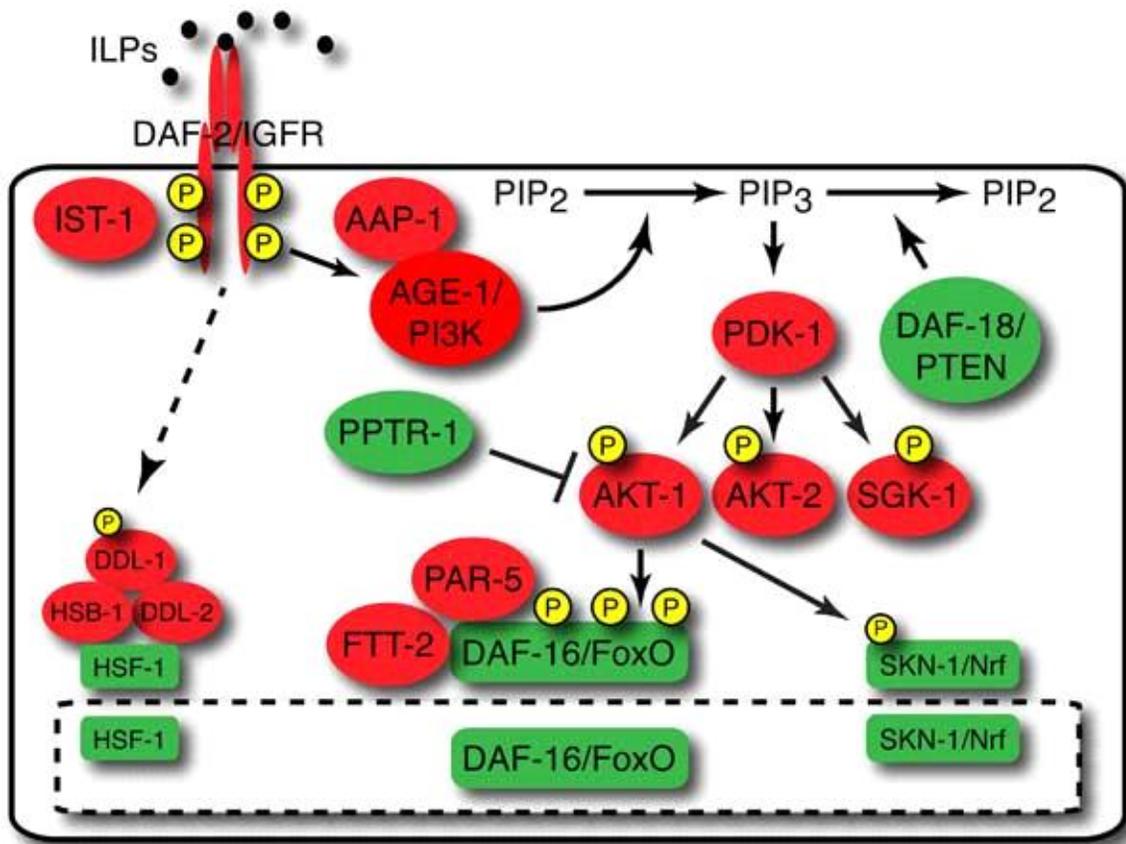


Figura 3. Vía de señalización de la insulina en *C. elegans* (4)

3.6 Estrés oxidativo

Se define el estrés oxidativo como un desbalance entre las especies reactivas oxidantes oxígeno/ nitrógeno y la capacidad de respuesta antioxidante del organismo. El estrés oxidativo surge por el aumento de ROS/RNS y una disminución de la habilidad de protección antioxidante, caracterizado por la reducción en la capacidad de los sistemas endógenos para combatir los ataques oxidativos dirigido a blancos biomoleculares. Se trata el efecto del estrés oxidativo en diferentes procesos morbosos como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, enfermedades inflamatorias

y urolitiasis. (33)

A pesar de que existen evidencias experimentales que sugieren que el estrés oxidativo puede determinar el inicio y la progresión de las complicaciones tardías de la DM, todavía hay controversia sobre si el incremento de este fenómeno sólo es asociativo y no causal. Cada vez hay más evidencias que muestran que pacientes con DM presentan un aumento en el estrés oxidativo y los procesos de inflamación, siendo mayores en aquellos que presentan complicaciones propias de la patología, caracterizadas por una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes y un incremento de los productos de oxidación. La pérdida de balance en el equilibrio pro-oxidante/antioxidante que se ha observado en la DM puede explicar el daño oxidativo que presentan las macromoléculas, dando lugar a alteraciones oxidativas en el DNA, las proteínas y los lípidos. De igual forma las deficiencias en los sistemas antioxidantes se han asociado con un incremento en el riesgo de las complicaciones de la DM y por lo anterior se ha propuesto la evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes y la lipoperoxidación en la sangre como marcadores de riesgo de microangiopatías en pacientes con DM. (34)

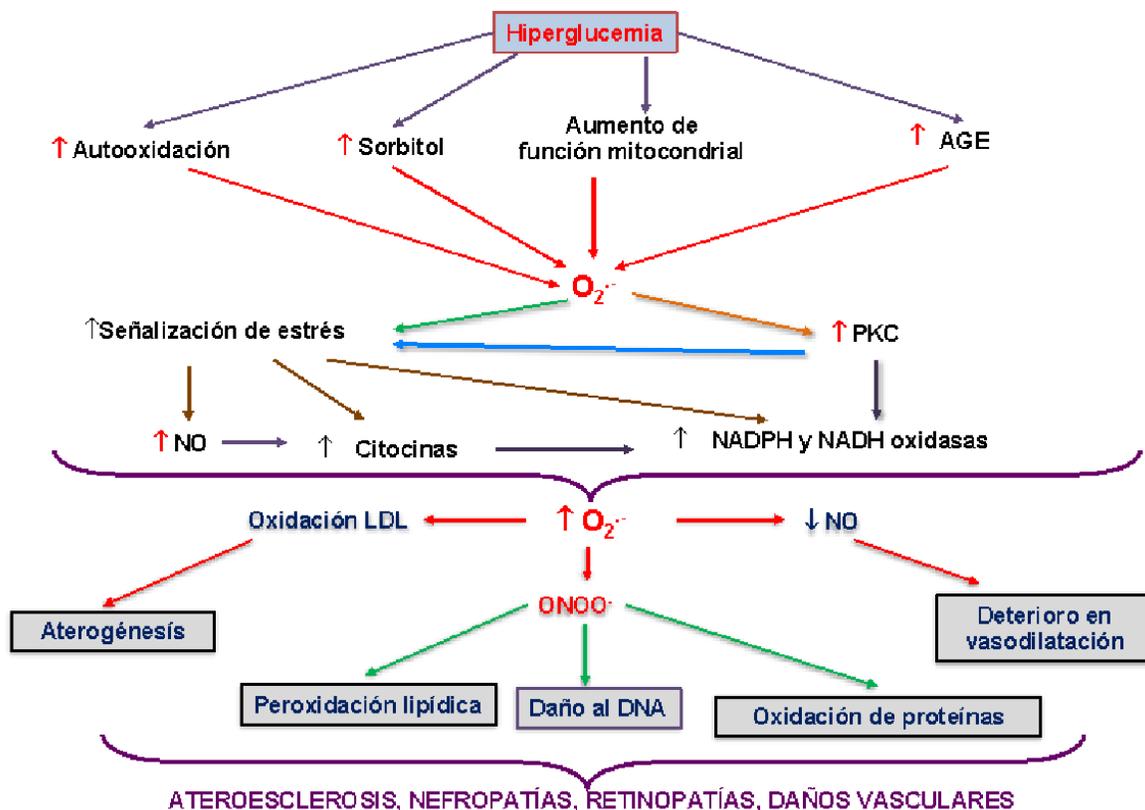


Figura 4. Esquema de los mecanismos que explica como la hiperglucemia contribuye al daño oxidativo (34)

La hiperglucemia puede conducir a un incremento en las vías de la autooxidación, el sorbitol, los productos de glicación avanzada y la cadena respiratoria, todas ellas llevan a generar el radical O₂·- radical que estimula la actividad de PKC, las vías de señalización de estrés lo cual induce una mayor síntesis de óxido nítrico (NO.) y por lo tanto un aumento en citocina, de estrés, lo que finalmente contribuye junto con la propia señalización de estrés y la PKC a incrementar la actividad de las NADPH y NADH oxidasas. (34)

4. Diseño metodológico

4.1. Tipo de investigación: descriptivo experimental, no aleatorio.

Universo, Población y Muestra

Universo: Nematodo *Caenorhabditis elegans*

Población: Cepa salvaje N2

Muestra: Cepa salvaje donada por la Universidad Mayor de Chile.

4.2. Hipótesis, variables, indicadores

Hipótesis: El extracto etanólico de *B. variegata* Linn ayuda a disminuir los rasgos fenotípicos y fisiológicos evidenciados en *C. elegans* con aumento de glucosa.

Variable independiente: Extracto etanólico de *B. variegata* Linn.

Variable dependiente: *C. elegans*, Características fenotípicas y fisiológicas.

Indicadores: Tamaño del cuerpo, movilidad, Proliferación, estrés oxidativo.

5. Técnicas y procedimientos

5.1. Extracto etanólico

Las hojas se pusieron a secar en un horno de secado a 60°C aproximadamente durante un periodo de 2 días posteriormente se separaron en una licuadora marca Vitamix, Vita-PREP a la velocidad más lenta, es decir a 1; como peso seco se obtuvieron 690 g. Una vez macerada se procede a pesar dicha planta, el resultante de la maceración se deja en etanol al 96% , se usaron 8.6 litros de dicho etanol y se filtró por el método del percolador, con el

fin de extraer impurezas que están en el material vegetal, para posteriormente extraer el etanol a través de un rota evaporador (80°C/presión de 550 mbar/2 horas); el extracto se dejó en una cápsula de porcelana y se puso en una estufa a baño maría aproximadamente a 120°C durante un periodo de tiempo de 48 horas para lograr eliminar la mayor cantidad de etanol del extracto y dejarlo listo para su uso.

Posterior a la elaboración del extracto se llevaron a cabo las diluciones para poder trabajar con los nematodos, estos se llevaron a cabo con DMSO (Dimetil sulfoxido) y pequeñas concentraciones de extracto.



Figura 5. Proceso para la obtención del extracto etanolico. A. Hojas de *B. variegata Linn* B. Material vegetal seco y siendo pesado. C. Metodo del percolador, al cual fue expuesto el extracto. D. Rotaevaporador BUCHI B-100. E. Extracto terminado.

5.2. Identificación de fitocompuestos

Para la identificación de los fitocompuestos se hizo por medio del ensayo en tubos, para identificación de Quinonas se usó HCl concentrado y se observó la formación de un precipitado color amarillo. Para ver la presencia de flavonoides se usó una pequeña parte del extracto y se disolvió en H₂SO₄, al verse una coloración amarilla es positivo para flavonoides, una coloración naranja para flavonas y rojo-azuloso para chalconas. Para observar alcaloides se usó el reactivo de Wagner. (1.27g de yodo y 2g de yoduro de potasio en 100mL de agua) y se observó la formación de color rojizo precipitado marrón. Para saponinas, se usó una pequeña cantidad de extracto y se agregó agua, esto se agito por un momento, al observarse una formación de espuma por más de dos minutos, daba positivo para saponinas. Para observar terpenos se usó la prueba de Liebermann-Burchard: se mezcló 1mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió a 0° y se le añadió una gota de H₂SO₄. Se interpretó como positivo se ocurrió formación de colores azul, verde, rojo o anaranjado. (48)

Una vez hecha la prueba en tubo, se procedió a realizar una cromatografía en capa fina para terpeno y para flavonoides a partir del extracto etanólico, se hizo una dilución de 10mg/ml con una solución de metanol: cloroformo en una relación 50:50.

5.2.1. Cromatografía de terpenos

Para la cromatografía se utiliza la dilución del extracto mencionada anteriormente, como patrón se usó Estigmasterol y se corrió con una fase móvil de Ciclo hexano: acetato de etilo en una proporción de 95:5. Se utilizó vainillina como revelador.

5.2.2. Cromatografía de flavonoides

Para la cromatografía de flavonoides se utiliza la dilución del extracto mencionada anteriormente, como patrón se usó Quercetina, se corrió con una fase móvil de n-Hexano: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético en una relación 70:30:1:1. Como revelador se empleó NPP (aminoetildifeniletilester) y PEG (polietilenglicol).

5.3. Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico sobre la cepa *E. coli* OP50

Para determinar si el extracto etanólico de *B. variegata var linn* no ejercía un efecto antimicrobiano sobre la cepa *E. coli* OP50. Lo primero fue igualar la OP50 a una escala McFarland 0.5 en caldo Mueller Hinton, luego se realizó una siembra masiva por medio de escobillón en una caja de agar Mueller Hinton. Se realizaron las diluciones del extracto a 0,1; 1 y 10 mg/dL; se impregnaron discos de papel filtro con estas concentraciones, se incubo por 24 horas a 37°C.

5.4. Mantenimiento del nematodo

Preparación de medio NGM y mantenimiento de *Escherichia coli* OP50. Para la preparación del medio NGM (Nematode Growth Medium) y el mantenimiento y siembra de la *E. coli* OP50 para la alimentación del modelo, se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Surco Felipe y estandarizado previamente en el grupo de Biotecnología y Genética UCMC (Ver anexo 1).

Sincronización. La sincronización se hace con el objetivo de tener todas las larvas del nematodo *C. elegans* en el mismo estadio larvario. Para esto se dejan crecer una cantidad considerable de nematodos en las placas con huevos en su interior, es decir, larvas en estadio L4 (Ver anexo 2).

Preparación de medio NGM con glucosa. Para la preparación del medio NGM con glucosa fueron preparados 250 mL del medio NGM siguiendo el protocolo establecido, con el único cambio de que se agregó al medio 40 mmoles/L para lograr una concentración de glucosa por gusano de 14 mmoles/L como fue descrito en la metodología utilizada por Heestand BN y colaboradores. (31). Para los 250 mL de glucosa la concentración en gramos equivalente a los 40 mmoles/L fue de 7,2gr/mL.

Preparación del medio NGM con extracto. Para la preparación del medio NGM con el extracto etanólico inicialmente se preparó el stock disolviendo los mg de peso inicial del extracto en DMSO, posteriormente se agregó al medio las concentraciones 0,1mg/ml, 1mg/ml y 10mg/7mL del extracto a partir de la fórmula: $V1 * C1 = V2 * C2$

5.5. Caracterización fenotípica y fisiológica.

La caracterización fenotípica se realizó antes y después de sembrar el nematodo en el medio NGM con glucosa y extracto de *B. variegata* Linn.

5.5.1. Ensayos de reproducción

Se realizó la sincronización de los nematodos, colocándolos en cada una de las cajas con y sin tratamiento, se esperó a que los gusanos llegaran al primer día de adultez, a partir de este momento se transfirieron diariamente de a una sola larva a nuevas placas de NGM/OP50, procedimiento que se realizó por 4 días, después de la postura de las larvas adultas se incubaron las cajas por dos días para que los huevos eclosionan y llegarán hasta la etapa larvaria L2 y L3, para realizar el conteo de las mismas.

5.5.2. Ensayo de Longitud

Se realizó la sincronización de los nematodos, se esperó a que llegaran hasta el estadio larvario L4 (hasta finalizar su periodo fértil) aproximadamente 6 días, una vez cumplido este periodo, se colocó una gota de Hidrocloruro de Levamisol en una lámina para

microscopía, para posteriormente transferirlas a la gota de dicha solución causal de parálisis (contracción muscular sostenida) y finalmente la muerte, para poder medirlos en un microscopio con reglilla milimetrada. La longitud se determinó en 10 nematodos por caja de Petri con cada tratamiento, teniendo en cuenta cada centímetro de diferencia que pueden presentar. Se realizó cada ensayo por triplicado.

5.5.3. Ensayo de movimiento

En este ensayo se realizó una sincronización, se esperó que los nematodos llegaran a un estadio larvario L4 (hasta terminar su periodo fértil) aproximadamente 6 días. Una vez cumplido este periodo se realizó el ensayo, tomando una larva y midiendo el número de movimientos que esta realizaba en forma de “S” durante un periodo de tiempo de 20 min, para inducir este movimiento por las larvas se utilizó el alambre de cobre estéril y con este se hacía un ligero toque a la larva para que esta se moviera.

5.6. Tinción de lípidos

5.6.1. Tinción con azul de Nilo

Para realizar la tinción de lípidos por medio del azul de Nilo se adaptó el protocolo empleado por Escorcía, W, en el año 2018. (14) Se usaron larvas en su cuarto día de adultez, en una placa de agar NGM. Inicialmente se hace un lavado a la caja con PBS al 1X, usando 1000 μ L. se debe sacar la mayor cantidad de nematodos posibles; esto se transfiere a un tubo eppendorf, para posteriormente centrifugarse a 4000rpm durante dos minutos, luego se descarta el sobrenadante y se vuelve a lavar con 1000 μ L de PBS al 1X. (Esto se realiza cuantas veces sea necesario para eliminar la mayor cantidad de bacteria presente y que queden solo los nematodos). Posterior a los lavados se elimina el sobrenadado de cada tubo y se agregan 600 μ L de isopropanol y se deja en agitación por un tiempo de 30 minutos. Pasado el tiempo, se centrifuga a 4000rpm durante un minuto, se vuelve a hacer un lavado con PBS al 1X. Luego del lavado, se ponen 600 μ L de tinción Azul de Nilo y se deja en agitación constante y aislada de la luz por una hora. Pasado el tiempo se realiza un último lavado con el fin de eliminar restos de colorante y se sirve el sobrenadante sobre láminas para poder observar al microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 450 nm.

5.6.2. Tinción con Sudan III

Para realizar la tinción de lípidos por medio del azul de Nilo, se necesitan larvas en su cuarto día de adultez, en una placa de agar NGM. Inicialmente se hace un lavado a la caja con PBS al 1X, usando 1000 μ L. se debe sacar la mayor cantidad de nematodos posibles; esto se transfiere a un tubo eppendorf, para posteriormente centrifugarse a 4000 rpm durante dos minutos, luego se descarta el sobrenadante y se vuelve a lavar con 1000 μ L de PBS al 1X. (Esto se realiza cuantas veces sea necesario para eliminar la mayor cantidad de bacteria presente y que queden solo los nematodos). Posterior a los lavados se elimina el sobrenadado de cada tubo y se agregan 600 μ L de isopropanol y se deja en agitación por un tiempo de 30 minutos. Pasado el tiempo, se centrifuga a 4000rpm durante un minuto, se vuelve a hacer un lavado con PBS al 1X. Luego del lavado, se ponen 600 μ L de tinción Sudan III y se deja en agitación constante y aislada de la luz por una hora. Pasado el tiempo se realiza un último lavado con el fin de eliminar restos de colorante y se sirve el sobrenadante sobre láminas para poder observar al microscopio.

5.7. Ensayo de estrés oxidativo

Para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizó el ensayo de Maldonado Miguel 2019 (18) brevemente modificada, se usaron nematodos con 4 días de adultez, Para revisar la supervivencia de los nematodos se expusieron a peróxido hidrogeno utilizándolo como oxidante y formador de especies reactivas de oxígeno a 0,5 mM; los ensayos se realizaron pasando a un medio NGM/OP50 40 larvas adultas con y sin tratamiento y exponiéndolas a 1 mL de H₂O₂, se dejaron en reposo a 25°C. Posteriormente cada hora durante 5 horas, la sobrevivencia de las larvas fue determinada mediante el toque al cuerpo del gusano y este debía mostrar un movimiento en “S”, de esta manera se contaban las larvas que seguían vivas a cada hora.

5.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa Graph Pad versión 7.0 (Graph Pad Prism). Se realizaron dos tipos de análisis, el primero de una ANOVA de dos vías para los datos que implicaran tratamientos a lo largo del tiempo. Y el segundo fue una ANOVA de una vía para comparar los datos obtenidos entre tratamientos. La significancia estadística fue

p=0.05, en donde se determinó como estadísticamente significativo los valores iguales o menores a dicho valor.

6. Resultados

Se evaluó la acción del extracto de *B. variegata* Linn en cepas de *C. elegans* antes y después de ser expuestas a una dieta rica en glucosa. Inicialmente se realizó una diferenciación de los estadios larvarios, posterior a esto se expuso la cepa salvaje a una dieta rica en glucosa midiendo los cambios presentados fenotípica y fisiológicamente, para finalmente evaluar los cambios ocurridos en dichas cepas después de exponerlas al extracto etanólico de la planta por medio de los ensayos de reproducción, longitud del cuerpo, movilidad y estrés oxidativo.

6.1. Obtención del extracto etanólico de *B. variegata* Linn.

Para la preparación del extracto etanólico se obtuvieron 690 g de material vegetal seco los cuales luego del proceso de percolación con el etanol al 96% permitieron obtener 133.64 g de extracto. El rendimiento aproximado de la planta se evaluó por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = (\text{Cantidad de extracto obtenido (g)} / \text{Cantidad total de material vegetal en peso seco (g)}) \times 100$$

Lo que dio un rendimiento aproximado de 19.36%.

Luego de llevar a cabo el extracto y hallar su rendimiento, se realizaron las diluciones con DMSO y se iniciaron tanto los ensayos como la diferenciación de estadios larvarios.

6.2. Identificación de fitocompuestos presentes en el extracto de la planta.

La identificación de fitocompuestos se hizo de dos maneras, inicialmente se llevaron a cabo unas pruebas en tubo para poder identificar que fitocompuestos podían estar presentes. En la tabla No 1, se puede apreciar la presencia de metabolitos secundarios como terpenos y flavonoides.

Metabolito secundario	Resultado prueba en tubo
Terpenos	+
Quinonas	-
Flavonoides	+
Alcaloides	+
Saponinas	+

Tabla 1. Metabolitos secundarios por método de tubo.

Luego del ensayo en tubo, se procedió a hacer una cromatografía en capa fina para Terpenos y una para Flavonoides.

Como se puede apreciar en la figura 6A al revelarse la cromatografía para terpeno, se puede apreciar una mancha grisácea, la cual se puede ver a lo largo del corrido cromatográfico, esto indica la presencia de Terpenos. Para observar presencia de flavonoides, en la imagen 6E, se puede observar manchas entre verdes y grises, las cuales indican que verdaderamente hay presencia de flavonoides en el extracto.

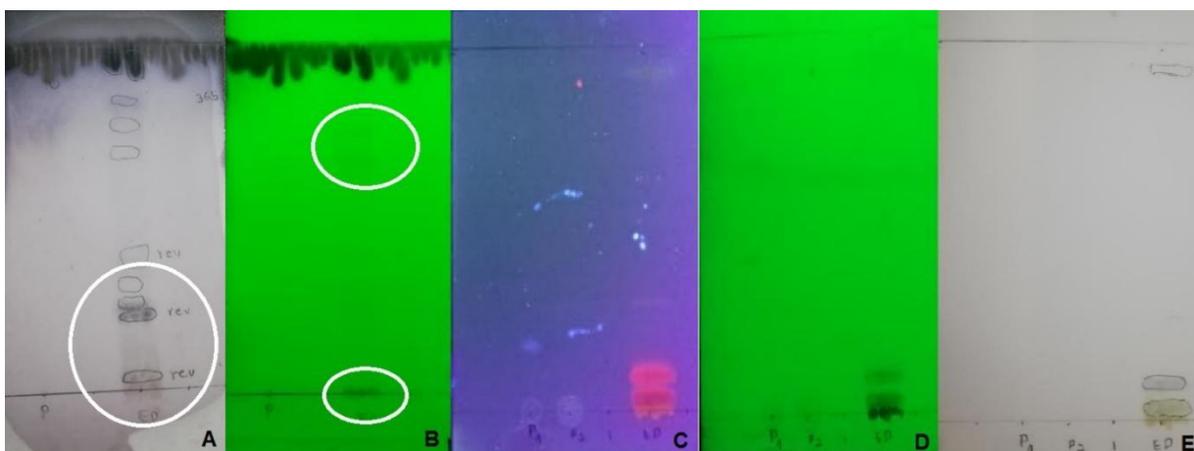


Figura 6. Cromatografía de terpenos y flavonoides. A. Cromatografía de terpenos revelada. **B.** Cromatografía de terpenos vista a 250nm **C.** Cromatografía de flavonoides vista en cámara de luz UV **D.** Cromatografía de flavonoides vista a 250nm **E.** cromatografía de flavonoides revelada.

6.3. Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico sobre la cepa *E. coli* OP50

Pasadas las 24 horas de incubación de la cepa *E. coli* OP50 con las diferentes concentraciones del extracto, se demostró que el extracto etanólico de la planta *B. variegata linn* no generó ninguna inhibición del crecimiento de la bacteria.

6.4. Diferenciación de los estadios larvarios de la cepa N2 salvaje bajo diferentes condiciones.

Una vez realizada la sincronización, los huevos obtenidos se colocaron en un medio NGM con la cepa *E.coli* OP50, se dejó transcurrir un tiempo aproximado de 8 horas que es lo que tarda el nematodo en pasar de un estadio embrionario al estadio larvario L1, este estadio es caracterizado por su pequeño tamaño que no permite diferenciar ningún órgano interno. Pasadas 8 horas, el estadio L1 pasó a ser un estadio L2, donde se ve un pequeño alargamiento a nivel interno y se empiezan a diferenciar un poco más sus órganos internos. A las 6 horas se pudo evidenciar que esta larva paso de un estadio L2 a ser un poco más grande y se aprecia una complejidad interna más grande por ende se considera una larva L3. Aproximadamente 6 horas más tarde, se pueden apreciar todas las estructuras internas del nematodo, como la vulva y el esófago, aquí se considera una larva L4 y se puede ver como en esta fase ya empieza su ciclo reproductivo durante el cual alcanza un tamaño de aproximadamente 1000-1100nm, este ciclo dura aproximadamente 6 días. (Figura No 7.)

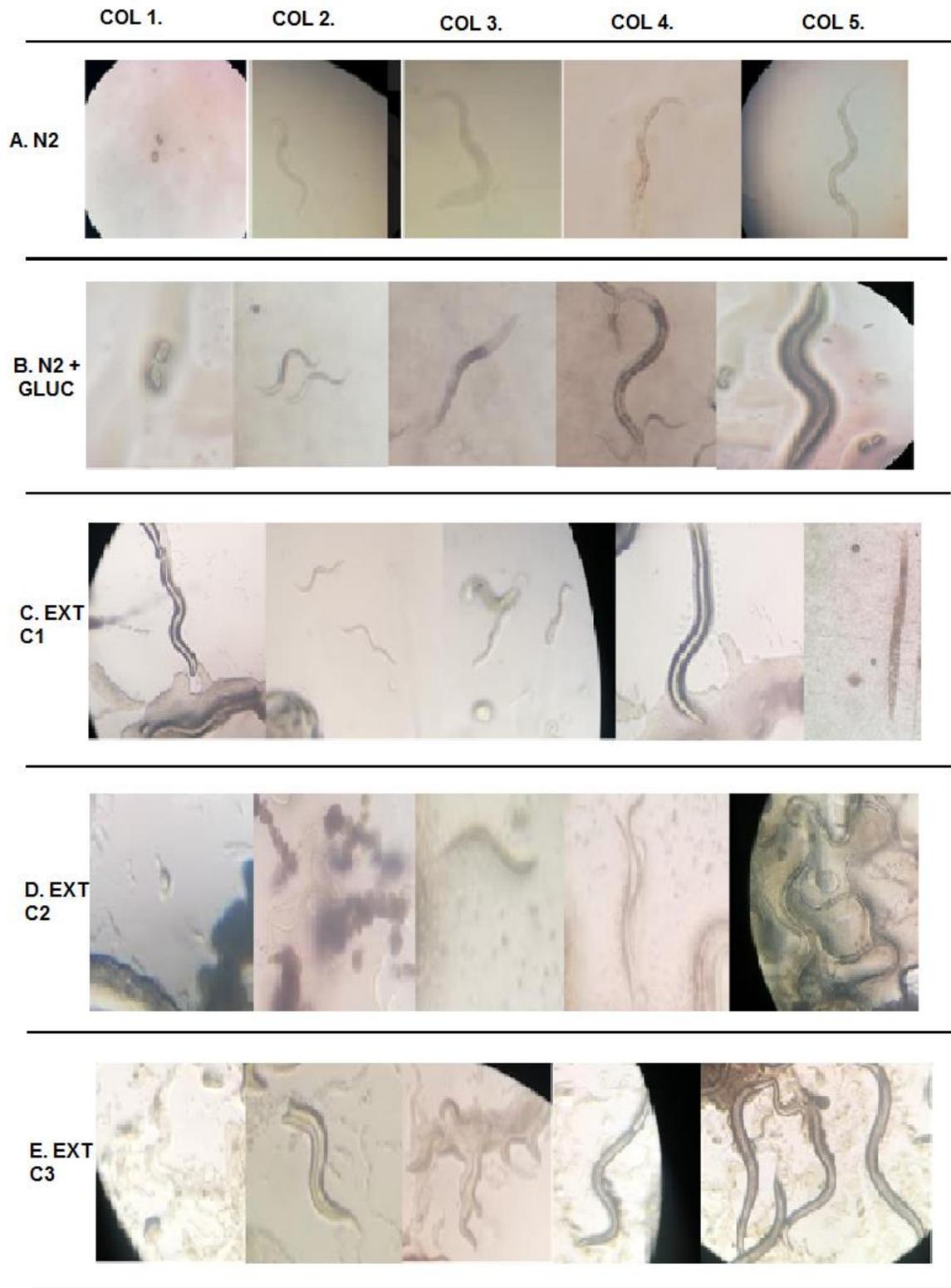


Figura 7. Diferenciación de los estadios larvales del nematodo expuesto a diferentes condiciones. A. Estadios larvales del nematodo N2 perteneciente a la cepa salvaje. A1.

Huevos. **A2.** Larva L1. **A3** Larva L2. **A4.** Larva L3. **A5.** Larva L4. **B.** Estadios larvales del nematodo N2 alimentado con una dieta rica en glucosa. **B1.** Huevos. **B2.** Larva L1. **B3** Larva L2. **B4.** Larva L3. **B5.** Larva L4. **C.** Estadios larvales del nematodo N2 alimentado con una dieta rica en glucosa y tratada con extracto de *B. variegata Linn* a una concentración de 0.1mg/mL. **C1.** Huevos. **C2.** Larva L1. **C3** Larva L2. **C4.** Larva L3. **C5.** Larva L4. **D.** Estadios larvales del nematodo N2 alimentado con una dieta rica en glucosa y tratada con extracto de *B. variegata Linn* a una concentración de 1 mg/mL. **D1.** Huevos. **D2.** Larva L1. **D3** Larva L2. **D4.** Larva L3. **D5.** Larva L4. **E.** Estadios larvales del nematodo N2 alimentado con una dieta rica en glucosa y tratada con extracto de *B. variegata Linn* a una concentración de 10 mg/mL. **E1.** Huevos. **E2.** Larva L1. **D3** Larva L2. **E4.** Larva L3. **E5.** Larva L4.

6.5. Caracterización fisiológica de la cepa N2 sometida a altas concentraciones de glucosa y al extracto

La caracterización fisiológica se llevó a cabo una vez obtenidos los huevos a partir de la sincronización. El análisis de las características fisiológicas se realizó comparando la cepa N2 sin tratamiento, la cepa expuesta a altas concentraciones de glucosa y ante diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *B. variegata Linn*.

6.5.1. Reproducción

El primer ensayo que se llevó a cabo fue el de reproducción, en condiciones normales una larva adulta de la cepa N2 pone aproximadamente 200 – 300 huevos a lo largo de su vida reproductiva, alcanzando su pico máximo en postura de huevos entre el día 2 y 3 como se puede observar en la gráfica (Figura N° 8). Respecto a la cepa N2/Glucosa se observó una disminución notable en la postura de huevos por parte de las larvas demostrando así que las concentraciones altas de glucosa afectan en la reproducción del nematodo; similar a la N2 presentó su pico máximo en postura los días 2 y 3 del ensayo.

Posteriormente la cepa N2/Glucosa se expuso a 3 concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *B. variegata Linn* a 0,1; 1 y 10 mg/mL. En los resultados de la cepa N2/Glucosa expuesta a la concentración de 0,1 mg/mL y 1 mg/mL se observa un leve aumento en la postura de los huevos del nematodo igualando en el día 2 a la cepa N2 y superándose en el día 3 alcanzando su pico máximo en la postura de huevos. Por último, en la concentración de 10 mg/mL se visualiza un aumento considerable en la postura de

huevos de la larva desde el primer día, alcanzando su pico máximo el 3 día superando a la cepa N2 demostrando que el extracto etanólico tiene efecto positivo en los cambios presentados en la cepa cuando se expone a altas concentraciones de glucosa y después se somete a tratamiento.

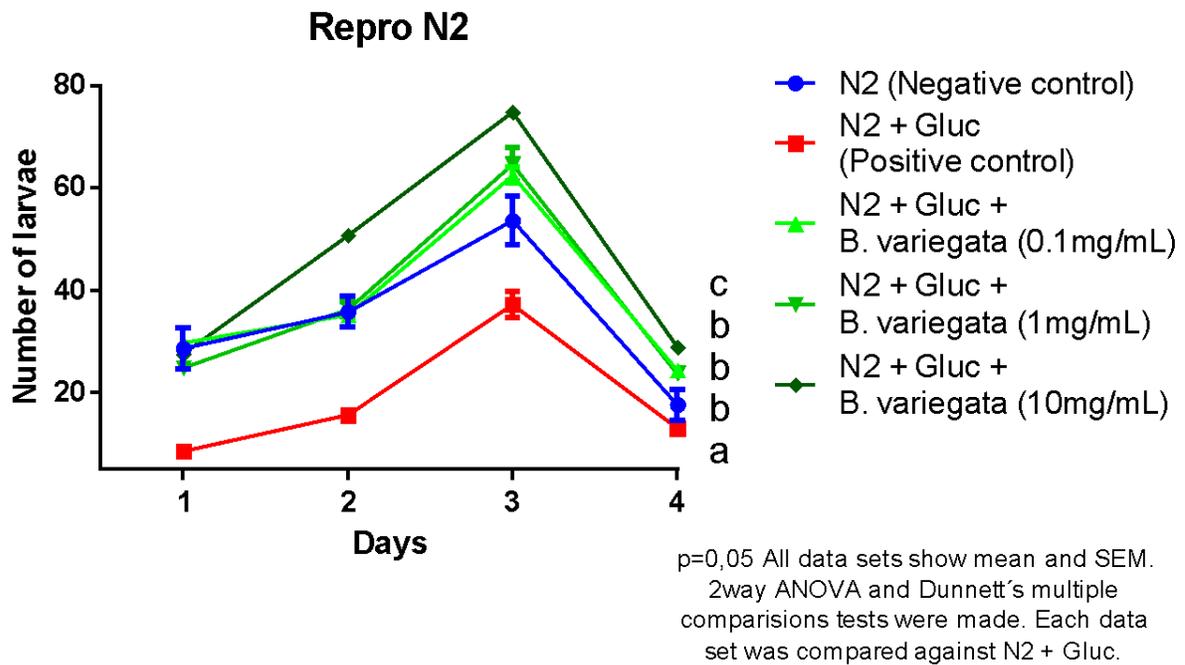


Figura 8. Ensayo de Reproducción. Comparación fisiológica del ensayo de reproducción de la cepa N2 salvaje (vista en color azul), la cepa N2 alimentada con una dieta alta en glucosa (vista en color rojo), la cepa N2 que fue alimentada con dieta alta en glucosa y posteriormente tratada con tres concentraciones de extracto (vistas en color verde). Se puede observar que el nematodo al ser alimentado con una dieta alta en glucosa presenta una gran disminución en la producción de huevos.

6.5.2. Longitud.

En el ensayo de la longitud del cuerpo del nematodo adulto, se midieron 10 larvas de N2; N2/Glucosa y de las concentraciones 0.1, 1 y 10 mg/mL del extracto etanólico de *B. variegata* Linn. (Figura 9)



Figura 9. Nematodos vistos al microscopio de reglilla. A. Comparación fisiológica del ensayo de longitud de la cepa N2 salvaje. **N B.** la cepa N2 alimentada con una dieta alta en glucosa. **C.** Nematodo alimentado con una dieta rica en glucosa y tratado con extracto de *B. variegata Linn* a una concentración de 0.1 mg/mL. **D.** Nematodo alimentado con una dieta rica en glucosa y tratado con extracto de *B. variegata Linn* a una concentración de 1 mg/mL. **E.** Nematodo alimentado con una dieta rica en glucosa y tratado con extracto de *B. variegata Linn* a una concentración de 10 mg/mL.

La larva adulta de la cepa N2 en condiciones normales mide aproximadamente entre 1 – 1.1 mm; como se observa en la Figura N° 10 las cepas N2 y N2/Glucosa no presentan variaciones considerables en la longitud de la larva adulta; sin embargo, cuando la larva es sometida al tratamiento con el extracto etanólico de *B. variegata Linn* en la concentración de 0,1 mg/mL, se presenta una disminución en la longitud del cuerpo de la larva, ya en la concentración de 1mg/mL se muestra normalidad en la longitud respecto a la cepa N2. Finalmente, con la concentración de 10 mg/mL se observa un aumento considerable en la longitud del cuerpo de las larvas respecto a la cepa N2 y N2/Glucosa. En este ensayo de longitud se puede ver una diferencia en el tamaño del cuerpo de las larvas expuestas al tratamiento con el extracto; se demostró que a mayores concentraciones de extracto mayor el tamaño de los nematodos.

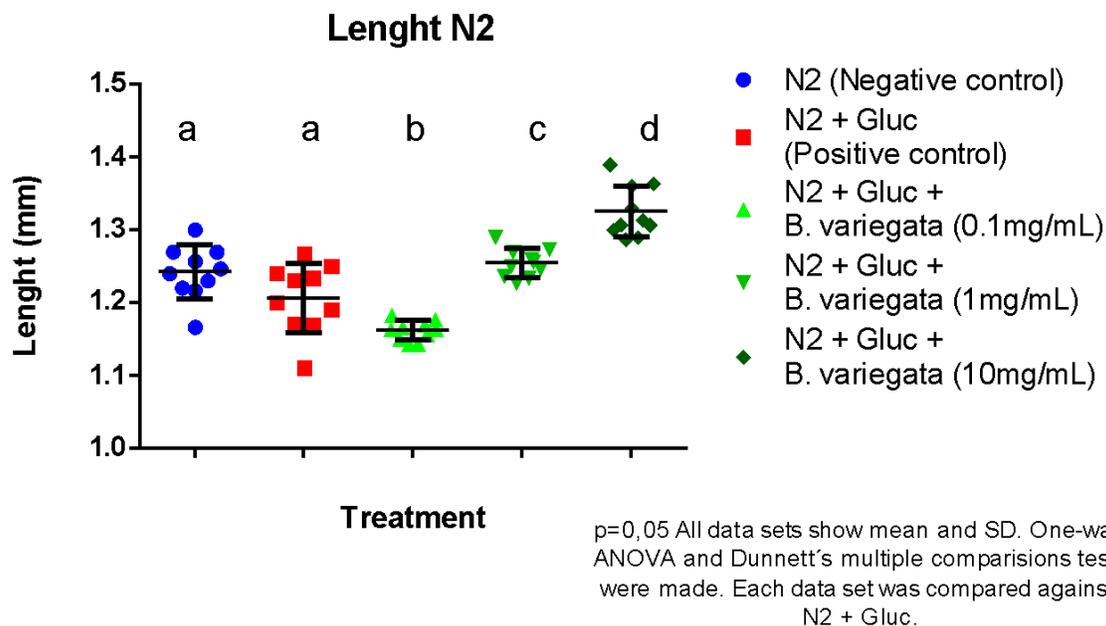


Figura 10. Ensayo de longitud. Comparación fisiológica del ensayo de longitud de la cepa N2 salvaje (vista en color azul), la cepa N2 alimentada con una dieta alta en glucosa (vista en color rojo), la cepa N2 que fue alimentada con dieta alta en glucosa y posteriormente tratada con tres concentraciones de extracto (vistas en color verde). Se puede observar que el nematodo al ser tratado con la concentración más alta del extracto presenta un aumento en el tamaño de las larvas.

6.5.3. Movimiento.

En el ensayo de movilidad de los nematodos, se observó cuantos movimientos en forma de “S” realizaba una larva adulta durante un periodo de tiempo de 20 seg. Se puede evidenciar que la cepa N2/Glucosa tiene una disminución en los movimientos respecto a la cepa N2. Cuando la cepa N2/Glucosa es sometida al tratamiento con el extracto etanólico de *B. variegata Linn* en la concentración de 0,1 mg/mL se puede ver que la cepa posee una cantidad de movimientos similares a los de la cepa N2. Finalmente, en las concentraciones del extracto con 1 y 10 mg/mL se visualiza un aumento en la cantidad de movimientos en forma de “S” de los nematodos, demostrando que el tratamiento con el extracto etanólico tiene efectos favorables en la movilidad y, por tanto, en la estructura motora del cuerpo del nematodo.

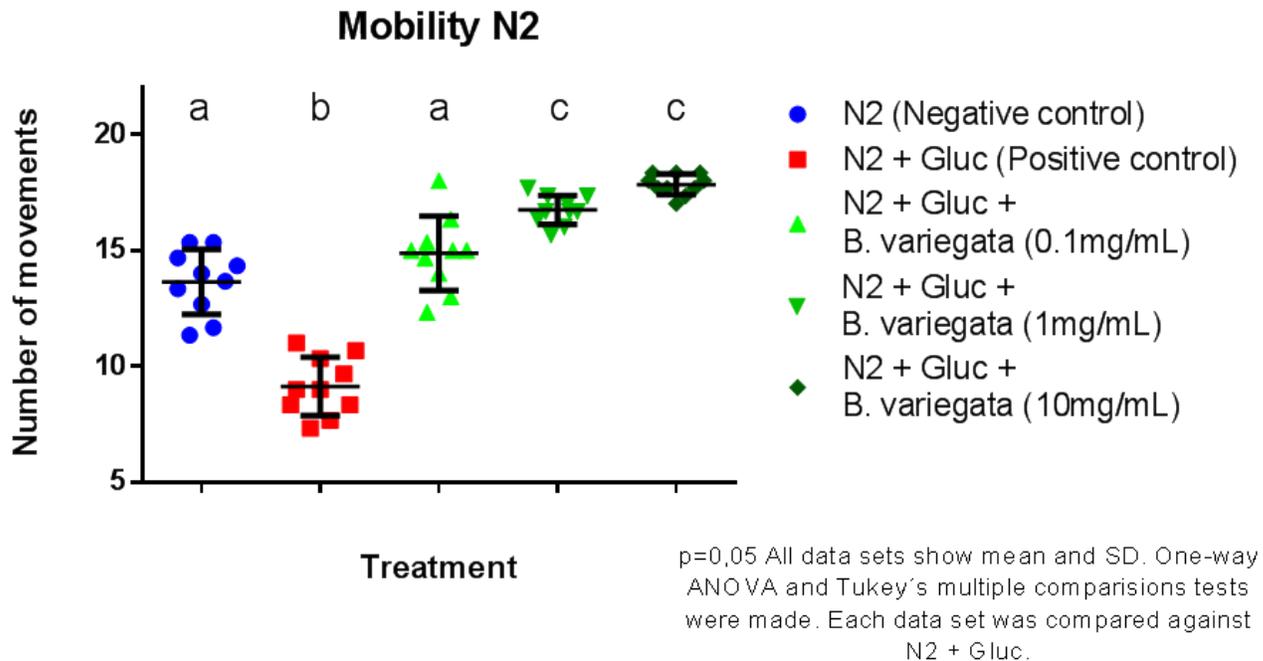


Figura 11. Ensayo de Movilidad. Comparación fisiológica del ensayo de movilidad de la cepa N2 salvaje (vista en color azul), la cepa N2 alimentada con una dieta alta en glucosa (vista en color rojo), la cepa N2 que fue alimentada con dieta alta en glucosa y posteriormente tratada con tres concentraciones de extracto (vistas en color verde). Se puede observar que el nematodo al ser tratado con el extracto etanólico de *B. variegata* Linn aumenta favorablemente su movilidad.

6.6. Evaluación del efecto lipolítico del extracto etanólico de las hojas de *B. variegata* Linn sobre el nematodo *C. elegans* a partir de la tinción Azul de Nilo y Sudan III.

El efecto lipolítico del extracto en el nematodo fue evaluado por medio de dos tinciones, la tinción Sudan III, una tinción colorimétrica con afinidad por los lípidos, como puede observarse en la figura 12. Los nematodos que han sido sometidos a una dieta rica en glucosa presentan un acumulo en sus lípidos y una desorganización en sus órganos internos. A medida que se van administrando las diferentes concentraciones del extracto, se puede observar, que, a mayor concentración de extracto, la disminución en los lípidos es mayor.

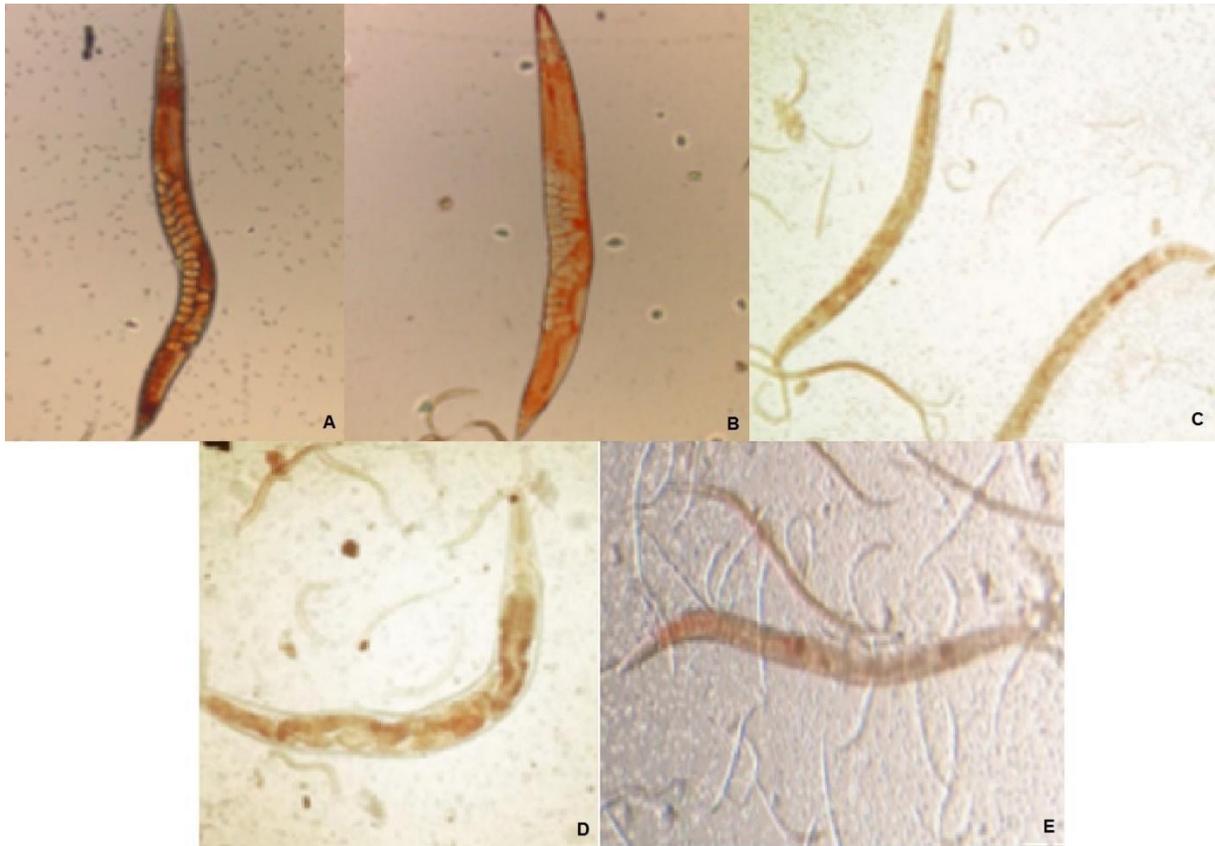


Figura 12. Tinción Sudan III. **A.** Nematodo N2 cepa salvaje. **B.** Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa. **C.** Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa y tratado con una concentración de extracto de 0.1mg/mL. **D.** Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa y tratado con una concentración de extracto de 1mg/mL. **E.** Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa y tratado con una concentración de extracto de 10 mg/mL.

Así mismo, en la figura 13 se puede ver cómo por medio de la tinción fluorescente Azul de Nilo, que a medida que la concentración del extracto administrada al nematodo va aumentando, la cantidad de lípidos observada va disminuyendo.

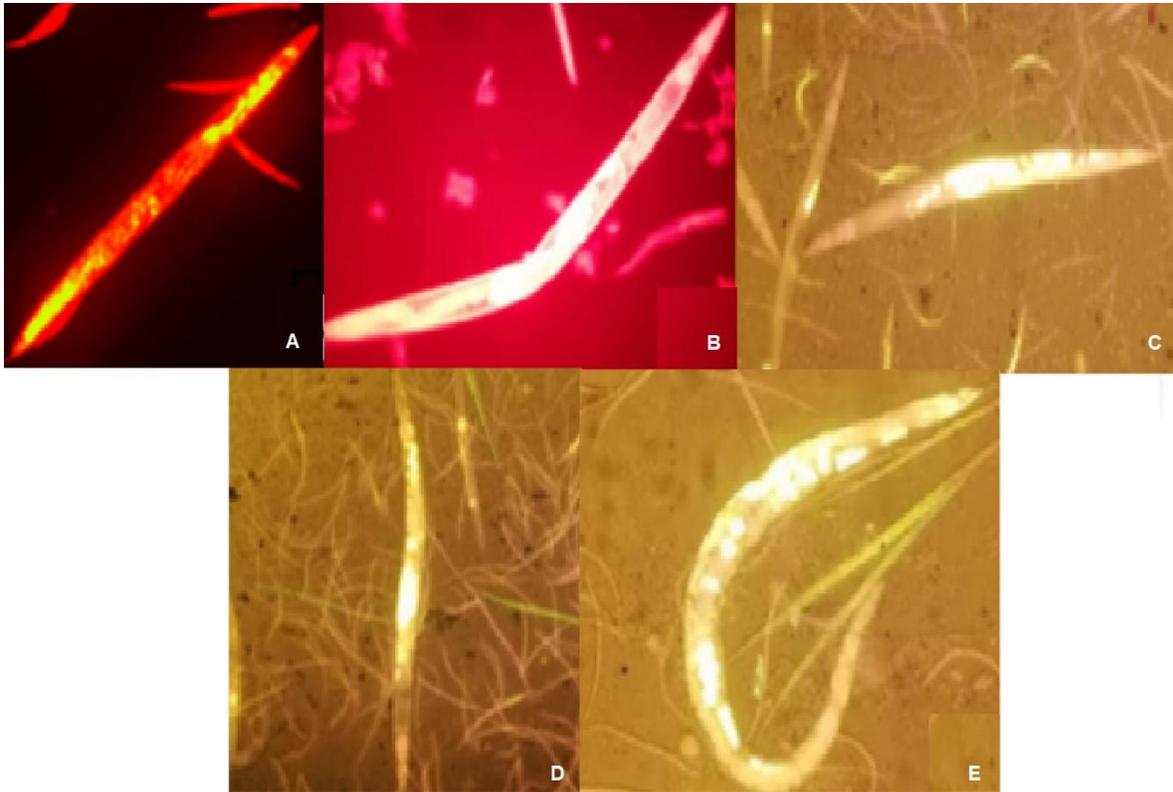


Figura 13. Tinción Azul de Nilo. A. Nematodo N2 cepa salvaje. B. Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa. C. Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa y tratado con una concentración de extracto de 0.1mg/mL. D. Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa y tratado con una concentración de extracto de 1mg/mL. E. Nematodo sometido a una dieta rica en glucosa y tratado con una concentración de extracto de 10 mg/mL.

6.7. Actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *B. variegata* Linn sobre el nematodo *C. elegans*

Por último, el ensayo de estrés oxidativo se llevó a cabo durante un periodo de 5 horas, en el cual se midió la mortalidad de 40 larvas que fueron expuestas a H₂O₂. Las larvas de la cepa N2 mostraron una resistencia favorable a la exposición de H₂O₂, sin embargo, la cepa N2/Glucosa demostró que su capacidad para resistir el peróxido de hidrógeno se disminuye, presentando mayor mortalidad de larvas respecto a la cepa N2. Al momento de tratar la cepa N2/Glucosa con el extracto etanólico en concentración de 0.1 y 1 mg/mL las larvas presentaron una resistencia al estrés oxidativo similar al de la cepa N2, demostrando mejoría después de ser tratadas con el extracto. Finalmente, en la cepa N2/Glucosa tratada con la concentración más alta del extracto (10 mg/mL) se presentó una resistencia mayor a

la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), visualizando una mayor cantidad de larvas vivas con respecto a la cepa N2.

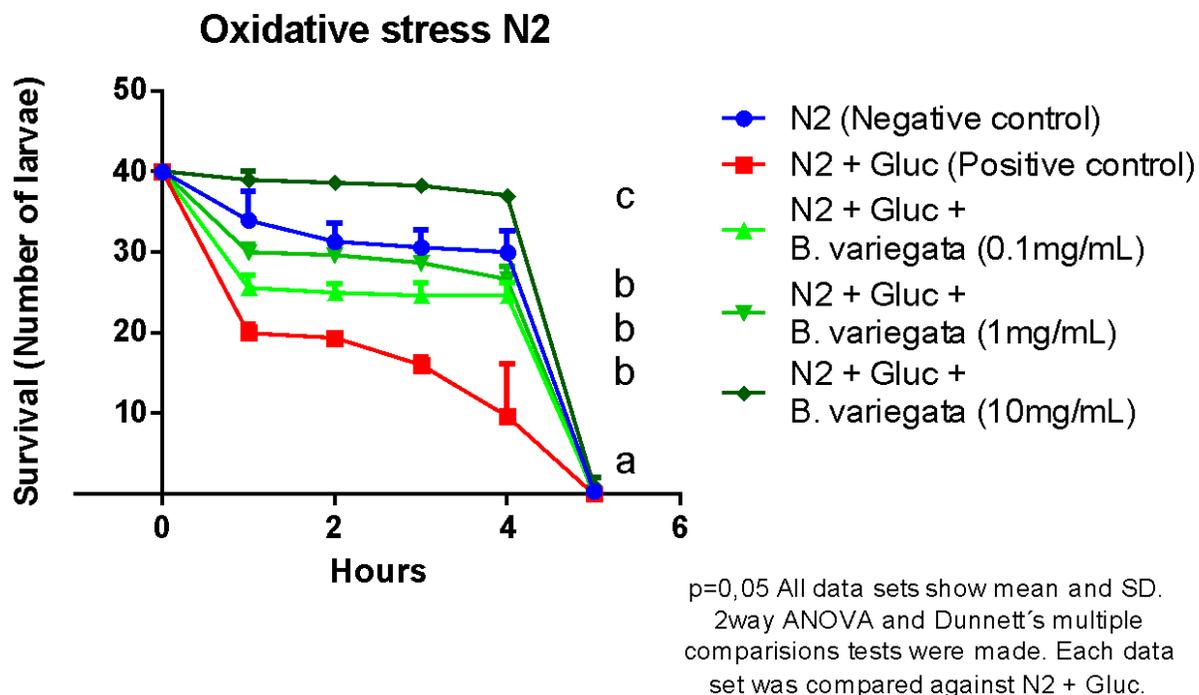


Figura 14. Ensayo de estrés oxidativo. Comparación del ensayo de estrés oxidativo de la cepa N2 salvaje (vista en color azul), la cepa N2 alimentada con una dieta alta en glucosa (vista en color rojo), la cepa N2 que fue alimentada con dieta alta en glucosa y posteriormente tratada con tres concentraciones de extracto (vistas en color verde). Se puede observar que el nematodo al ser expuesto a un agente oxidante (H_2O_2) y luego tratado con el extracto etanólico de *B. variegata* Linn presenta una mayor resistencia a la formación de ROS.

7. Discusión

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce la suficiente insulina (hormona encargada de regular los niveles de glucosa en sangre) o cuando las células del cuerpo no pueden utilizar con eficacia la insulina que produce. (46) Para el día mundial de la Diabetes la OPS plantea que aproximadamente 62 millones de personas en las américas padecen Diabetes Mellitus tipo 2 y se estima que para el 2040 sean 109 millones de personas; en Colombia se presenta en un 4 al 8% de la población, registrándose, así como la cuarta causa de mortalidad y morbilidad. Sin embargo, entre el 30 – 40% de las personas que padecen DM desconocen

poseerla, debido a que la enfermedad se encuentra relacionada a la obesidad, el sobre peso y hábitos alimenticios. (47)

Para el estudio de la Diabetes se han utilizado diferentes modelos animales que han permitido conocer la fisiopatología de la enfermedad, entre los más usados se encuentran el ratón y el nematodo *C. elegans*, este último destacándose como modelo biológico experimental por su corto ciclo de vida y su vía de señalización de la insulina similar en un 90% a la del humano.

En el presente trabajo, se buscó evaluar el efecto lipolítico y antioxidante del extracto de una planta conocida empíricamente por su acción hipoglucemiante en pacientes que padecen DM. Para esto se realizó un extracto etanólico proveniente de 690 g de hojas de *B. variegata* Linn; se realizó un proceso de percolación con el fin de hacer una extracción lo más completa posible de los principios activos de la planta para obtener un extracto de calidad. Una vez terminado el extracto etanólico se midió el rendimiento aproximado de la planta, como lo hizo Khumar. A; se denomina de esta manera, ya que se desconoce la cantidad exacta de etanol que aún permanece en el extracto, puesto que, aunque se remueve una gran cantidad de él mismo, en la rota evaporación y el baño maría, es probable que el extracto final posea pocas concentraciones de etanol. (54)

Posteriormente, se realizó una identificación de los fitocompuestos presentes en el extracto, se destacó la presencia de flavonoides que, según Ortiz H, (49) son los encargados de la capacidad antioxidante de la planta, por otro lado, se observó la presencia de terpenos que se encuentran asociados a la actividad lipolítica e hipoglucemiante. Se eligió la caracterización de estos fitocompuestos ya que son las más mencionadas y trabajadas en el estudio de diferentes enfermedades metabólicas entre ellas la diabetes (12).

En las investigaciones realizadas con el *C. elegans* en Diabetes es importante garantizar que el nematodo cuente con las condiciones necesarias para sobrevivir, una de ellas es que tenga suficiente alimento; puesto que este se alimenta de *E. coli* OP50. Según A. Dhale (50) el extracto posee un efecto antibiótico sobre las cepas de *E.coli*; con el fin de verificar si las concentraciones manejadas inhiben el crecimiento adecuado de la cepa, se realizó un

antibiograma, que demostró que el extracto etanólico no ejercía ningún efecto perjudicial sobre la cepa *E. coli* OP50.

En el momento de trabajar con un modelo experimental como *C. elegans* es necesario conocer tanto su ciclo de vida como todos sus estadios larvarios como los menciona Ogg S. (7), para esto se llevó a cabo una caracterización fenotípica y fisiológica del nematodo expuesto en diferentes condiciones. Inicialmente, se detallan los estadios larvarios desde huevos hasta larva L4 de la cepa N2, N2 expuesta a una dieta alta en glucosa y con las concentraciones del extracto; observándose cambios en la morfología tanto de huevos como larvas, primeramente, a las altas concentraciones de glucosa y posteriormente a la acción del extracto.

Para evaluar los cambios fisiológicos que presentó la cepa N2, se realizaron diferentes ensayos como lo indica Jobson M.A, en un ensayo donde miro longevidad, reproducción y resistencia al estrés. (52) El nematodo *C. elegans* en condiciones normales pone aproximadamente entre 200-300 huevos alcanzando su pico máximo de postura entre el día 2 y 3 de vida fértil como lo menciono L, Byerly (7) ; en el trabajo se expuso a la cepa N2 a una dieta rica en glucosa la cual provocó cambios notables, produciendo una disminución en la cantidad de huevos que pone una larva normalmente, esto debido al aumento de glucosa presente en las larvas, se observa que en el nematodo como en los humanos al aumentar la concentración circulante de glucosa, la capacidad reproductiva se ve afectada como lo dice el autor Cervantes-Villagrana en su artículo Fisiopatología de la diabetes (25). Al exponer la cepa N2 alimentada con glucosa, a las concentraciones del extracto se observa un aumento ascendente en la postura de huevos, es decir, a mayor concentración del extracto mayor cantidad de huevos, mostrando mejoría al estado anterior de exposición a glucosa. De esta manera se observan resultados similares en los ensayos de longitud y movilidad realizados al nematodo en las mismas condiciones.

Una forma de visualizar los cambios producidos en el nematodo por las altas concentraciones de glucosa, es observar los acúmulos de grasa presentes en el cuerpo de la larva; esto se puede medir de forma cuantitativa o cualitativa; en el estudio se utilizó un método cualitativo como lo realizado por Escorcía. W. y colaboradores, donde ellos usan tinciones como Rojo de nilo y Oil Red O (53). En nuestro trabajo se adoptaron los protocolos de Escorcía. W. pero se usaron las tinciones Azul de Nilo y Sudan III, que a su

vez son tinciones que son específicas para teñir lípidos en tejidos. En este estudio el colorear las larvas con Azul de Nilo permitió visualizar los lípidos y permitió identificar los órganos internos en el cuerpo del nematodo, al apreciar los nematodos alimentados con glucosa, se puede observar que la glucosa ocasionó una entropía en los órganos internos del nematodo. A diferencia de lo visualizado por Escorcia W, en nuestro trabajo si se pudo observar una diferencia en cuanto a la organización corporal del nematodo. A la exposición con el extracto la cepa mostró una disminución de los depósitos de grasa y una mejoría en la organización interna de los órganos.

Para medir la actividad antioxidante del extracto de la planta, se llevó a cabo el ensayo de estrés oxidativo, el cual mide la capacidad que tiene el nematodo para resistir las especies reactivas de oxígeno (ROS) y convertirlas en agua e hidrogeniones libres, para esto se utilizó un ensayo simple en el cual se expone a las larvas a peróxido de hidrógeno y se midió su mortalidad en un lapso de tiempo; en la cepa N2 se observó que posee una buena capacidad de resistir los ROS producidos por el peróxido, en cambio en la cepa N2 expuesta a una dieta rica en glucosa se visualizó una mortalidad elevada por su poca capacidad de resistir los ROS, esto se debe a que los niveles altos de glucosa circulante en el nematodo y en los humanos produce una mayor cantidad de especies reactivas en el organismo como lo dice el autor Calderón J. en el estrés oxidativo y diabetes mellitus. Al exponer la cepa N2 con glucosa a las diferentes concentraciones del extracto etanólico se ve un aumento directamente proporcional, es decir, a mayor concentración del extracto, mayor capacidad del nematodo para resistir los cambios generados por el peróxido de hidrógeno, esto debido a la actividad antioxidante de la planta, que actúa disminuyendo la cantidad de ROS circulantes en el organismo como lo dice el autor Calderón J. en su artículo estrés oxidativo y diabetes mellitus. (34)

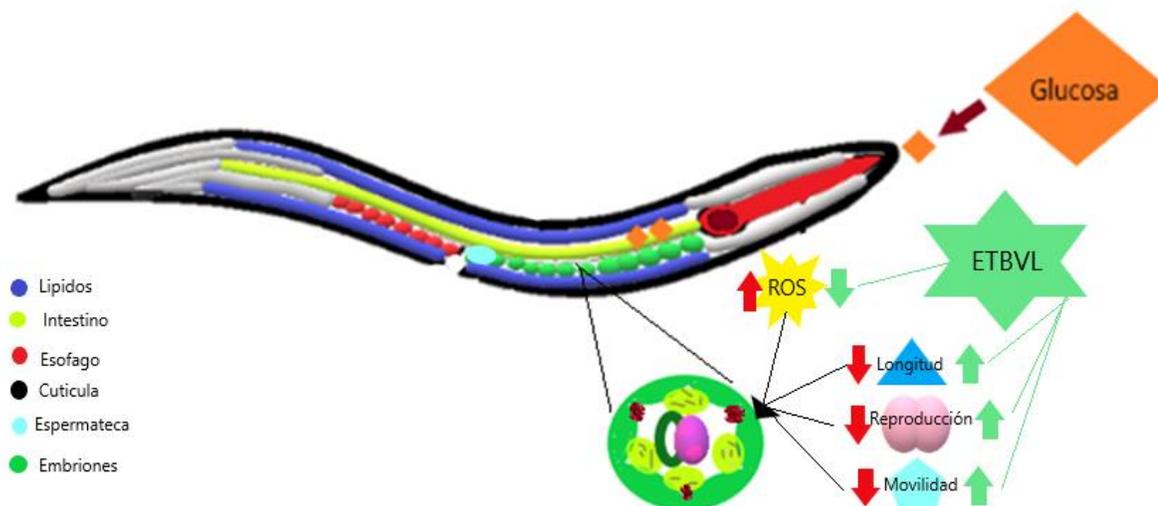


Figura 15. Modelo de diabetes. Se muestra el efecto del extracto etanólico de las hojas de *B. variegata Linn* sobre la cepa N2 expuesta a una dieta rica en glucosa. Las flechas rojas indican el aumento o disminución de los lípidos, de las distintas características fisiológicas y de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos en la cepa N2 con dieta de glucosa. Las flechas verdes indican los cambios fisiológicos positivos del extracto sobre el nematodo.

8. Conclusiones

- Entre los fitocompuestos identificados en el extracto etanólico de las hojas de *B. variegata Linn*, se encontró que posee flavonoides y terpenos que son los metabolitos que poseen la actividad hipoglicemiante y antioxidante de la planta.
- En la caracterización fenotípica del nematodo se encontró que se presentan cambios a lo largo del cuerpo y en las dimensiones del nematodo cuando se expuso a una dieta rica en glucosa, mostrando así una diabetes inducida.
- La exposición del nematodo a las concentraciones del extracto etanólico mostró una mejoría en la característica fenotípica de la larva, que habían cambiado durante el proceso de diabetes inducida.
- Respecto a la reproducción, longitud y movilidad del nematodo se identificó que, al exponerlo a las dietas altas de glucosa, se disminuye la capacidad de las larvas para poner huevos, moverse y en su tamaño.

- Las concentraciones del extracto etanólico mejoraron las actividades fisiológicas del nematodo, aumentando la postura de huevos, la movilidad y la longitud de la larva, mostrando la eficiencia del extracto de la planta.
- Al observar los depósitos de grasa del nematodo con las tinciones específicas, se identifican los cambios organizacionales de los órganos internos de la larva, y el aumento de tamaño de los depósitos de grasa. Después de la exposición del extracto etanólico los cambios presentados en el interior de la larva presenta una mejoría notable.
- Cuando se expone el nematodo a la producción de ROS, se observó una disminución a tolerar estas especies reactivas de oxígeno cuando se alimenta con una dieta rica en glucosa, mostrando una mayor mortalidad de larvas y después de la exposición del extracto presentó un aumento en la capacidad del nematodo a soportar estos ROS, mostrando que el extracto posee una actividad antioxidante.

9. Anexos

9.1. Anexo 1. Preparación de Medio NGM

Las cajas de Petri con medio NGM como se mencionó anteriormente se prepararon siguiendo el protocolo de Surco Laos estandarizado en el Semillero de Investigación Biotecnología y Genética UCMC.

1. Agregar 3gr de NaCl
2. Pesar 17 gr de Agar-agar
3. Adicionar 2,5 gr de peptona de un total de 975 mL de agua destilada.
4. Se esterilizó por 1 hora, a 121°C y 1 Atm de presión; posteriormente se dejó enfriar.
5. Para el enriquecimiento del medio se utilizó: 1 mL de CaCl₂, 1 mL de colesterol (5 mg/mL de etanol), 1 mL de MgSO₄ 1M, 25 mL de buffer KPO₄ 1M pH 6.0 (108,3 gr de KH₂PO₄, 35,6 gr de K₂HPO₄ en 1L de agua).
6. La solución de NGM se sirvió en placas de Petri en condiciones de esterilidad, llenando las cajas con 20 mL de medio aproximadamente. *

9.2. Anexo 2. Sincronización

Para realizar el procedimiento de sincronización en los nematodos, se preparan varias soluciones:

- Solución bleaching (solución de blanqueamiento)

En un tubo falcón de 10 mL se agrega una mezcla de 5 mL de NaOH, 3,8 mL de Hipoclorito al 5% y 1,2 mL de agua destilada.

- Buffer M9

Para 1L de agua destilada se agregan 3 gr de K_2PO_4 , 6 gr de Na_2PO_4 , 1 mL de $MgSO_4$ 1M, y se esteriliza en autoclave por 1 hora.

Posteriormente se llevan a cabo los siguientes pasos para la adecuada realización de la sincronización de los nematodos.

1. Se lavan las cajas con 3 mL de tampón M9 durante 5 minutos y se procede a recolectar 1.8 mL en un eppendorf.
2. Este tubo se centrifuga a una velocidad 4500 rpm durante 5 minutos eliminando el sobrenadante, se realiza esta acción dos veces (cuando se observa el eppendorf a contraluz, se visualizan larvas)
3. Se agregan 2 mL de bleaching se lleva a una agitación suave y constante durante 4 minutos, se centrifuga, se descarta el sobrenadante y se agregan 2 mL de buffer M9, se repite esta acción una vez más (o hasta no observar larvas a contraluz).
4. Se realizan dos lavados con buffer M9 donde se pueden observar unos puntos (huevos), lo que indica que la sincronización se realizó con éxito.
5. Se centrifuga una vez más, se descarta el sobrenadante y se agregan 200 uL de tampón M9, se suspende para finalmente colocar sobre una placa de NGM/OP50 y se incuba para lograr el desarrollo de los huevos al estadio Larvario L1.

9.3. Anexo 3. Certificado de la planta.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 71
Bogotá D.C., 26 de septiembre de 2019

Señores
DANIELA CORREALES
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica.

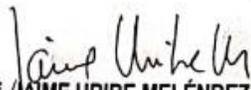
Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

☞ Nombre: *Bauhinia aff. Variegata* L.
☞ Familia: FABACEAE
☞ No. COL: 612117
☞ Colector: Daniela Corrales & Edwin Molano
No. Colecta: 1
Determinó: Garzón- Ladino, C. /2019

Permiso de recolecta / Permiso de Investigación: No aplica. Planta cultivada.

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.


Prof. JAIME URIBE MELÉNDEZ
Director
Herbario Nacional Colombiano -COL
Universidad Nacional de Colombia
E-mail: herbacol_fcboq@unal.edu.co

Copie: Archivo COL, Diego 7/2/19.

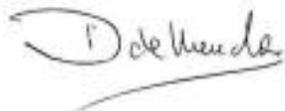
9.4. Anexo 4. Certificado de asistencia LAWM 2020

**Second Latin American Worm Meeting
February 19-21- 2020
Rosario- Argentina**



Rosario, February 21, 2020

We certify that **Daniela Alejandra Correales Molano** participated in the Second Latin American *C.elegans* Meeting held in Rosario, Argentina from February 19th to 21st 2020, presenting the poster "**Assessment of the lipolytic and antioxidant effect of the ethanol extract of the leaves of *Bauhinia variegata* Linn in experimental model of induced diabetes *Caenorhabditis elegans***"



Diego de Mendoza
Scientific Committee

9.5. Anexo 5. Certificados de asistencia RedColSI



XVII ENCUESTO REGIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN 2019

La Red Colombiana de Semilleros de Investigación
Nodo Bogotá - Cundinamarca

Otorga certificado a:
Yulieth Alejandra Castañeda

Con cedula de ciudadanía 1.233.496.858
en calidad de: **Ponente**

Por su participación en el XVII Encuentro Regional de Semilleros de Investigación,
Nodo - Bogotá - Cundinamarca, en la Fundación Universidad Autónoma de Colombia
durante los días 8, 9 y 10 de mayo de 2019.

German Eduardo Vargas Zapata
Coordinador RedCOLSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca

Carlos Edwin Carranza Gutierrez
Tesorero RedColSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca



XVII ENCUESTO REGIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN 2019

La Red Colombiana de Semilleros de Investigación
Nodo Bogotá - Cundinamarca

Otorga certificado a:
Daniela Alejandra Correales Molano

Con cedula de ciudadanía 1.026.299.948
en calidad de: **Ponente**

Por su participación en el XVII Encuentro Regional de Semilleros de Investigación,
Nodo - Bogotá - Cundinamarca, en la Fundación Universidad Autónoma de Colombia
durante los días 8, 9 y 10 de mayo de 2019.

German Eduardo Vargas Zapata
Coordinador RedCOLSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca

Carlos Edwin Carranza Gutierrez
Tesorero RedColSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca

10. Referencias bibliográficas

1. Hernández-ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. 2013;55(1):129-36.
2. OMS/PAHO. OPS/OMS - Diabetes [Internet]. Paho.org. 2019.
3. L. Byerly, R. C. Cassada, and R. L. Russel The Model *Caenorhabditis elegans* in Diabetes Mellitus and Alzheimer ' s Disease. 2009;16:3233.
4. Murphy CT, Hu PJ Insulina / señalización del factor de crecimiento similar a la insulina en *C. elegans*, WormBook ed. El *C. elegans* comunidad de investigación de WormBook, doi / 10.1895 / wormbook.1.164.1, <http://www.wormbook.org> .
5. Saha, Santanu y Subrahmanyam, EVS y Kodangala, Chandrashekar y Shastry, Shashidhara C (2011) Aislamiento y caracterización de triterpenoides y éster de ácido graso de triterpenoide de hojas de *Bauhinia variegata*. Der Pharma Chemica, 3 (4). pp. 28-37.
6. L.ByerlyR.C.CassadaR.L.Russell, The Life Cycle of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. 1976, Developmental Biology, 33:23-33.
7. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. 1997;389. Nature.
8. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2 , an Insulin Receptor – Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. 1997;277, Science.
9. Parekh J, Karathia N, Chanda S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata L.* bark. 2006;9:53-7. Africal Journal biomedical research.
10. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, et al. *Caenorhabditis elegans* as model for the study of high glucose mediated life span reduction. 2009;58. American diabetes Association.

11. Perea M, Jairo J. Taxonomía y funcionalidad del género *Bauhinia* Taxonomy and functionality of gender Bauhinia. :Revista Tumbaga, 119-34.
12. MSc. Maby M. Martínez, MSc. Diana M. Ocampo, BSc. Jhon H. Galvis, Andrea Valencia. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanolicos de *Bauhinia variegata* (Fabaceae). 2011
13. Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. Biomed Res Int. 2013;2013.
14. Pino EC, Webster CM, Carr CE, Soukas AA. Biochemical and High Throughput Microscopic Assessment of Fat Mass in *Caenorhabditis Elegans* 2 . Stamp Frozen Library Plates onto Rectangular Amp / Tet (A / T) LB Agar Plates 3 . Grow RNAi Bacterial Clones Overnight in Deep-well Blocks. 2013;(March) J Vis Exp :1-11.
15. Nubilde Martinez, Amaral Gil, Leydisabel Celis, Lucia Rodriguez, Feliz Romero, Carlos Espino, Dayana Requena. EFECTO HIPOGLICEMIANTE DE UN FITOFÁRMACO (DIAMET). 2014, Comunidad y salud Vol. 12.
16. Moreno-arriola E, Cárdenas-rodríguez N, Coballase-urrutia E, Pedraza-chaverri J, Carmona-aparicio L, Ortega-cuellar D. *Caenorhabditis elegans* : A Useful Model for Studying Metabolic Disorders in Which Oxidative Stress Is a Contributing Factor. 2014; Oxid Med Cell Longev. 2014.
17. Fitzenberger E, Deusing DJ. Effects of Plant Extracts on the Reversal of Glucose-Induced Impairment of Stress-Resistance in *Caenorhabditis elegans*. Plant Foods Hum Nutr. 2014 2014;78-84.
18. Iuri P, Bonilha DF, Camila P, Ferreira H. Biological potential of plants from the genus Bauhinia Potencial biológico de las plantas del género *Bauhinia*. 2015; Revista Cubana de farmacia, 49(3):583-94.
19. Resistance S, Jobson MA, Jordan JM, Sandrof MA, Hibshman JD, Lennox AL, et al. Transgenerational Effects of Early Life Starvation on on Growth, Reproduction, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 2015;201(September):201-12.
20. Watts JL, Ristow M. Lipid and Carbohydrate Metabolism in *Caenorhabditis elegans*. 2017;207(October): Genetics, 2015, 413-46.

21. Miranda-r1 J. *Caenorhabditis elegans* respond to high- glucose diets through a network of stress- responsive transcription factors. PloS One, 2018;1-24.
22. Science N, Kumar A, Info A, Anand V, Dubey RC, Goel KK. Evaluation of antioxidant potential of alcoholic stem bark extracts of *Bauhinia variegata* Linn ,2019, Journal of Applied and Natural Science, 11(1):235-9.
23. García AB. Actualización breve en diabetes para médicos de atención primaria. Rev Esp Sanid Penit 20172017;1:57-65.
24. Pérez-díaz I. Iván Pérez-Díaz*. Diabetes mellitus. Gac med Mex. 2016; 152
25. Cervantes-villagrana RD, Presno-bernal JM. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. 2013; Revista de endocrinología y nutrición, 21(3):98-106.
26. Anselmo Palacios, Maritza Durán, Oswaldo Obregón. factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. CAPÍTULO V. Revista venezolana de endocrinología y metabolismo, 2012.
27. Fei E, Ho J, Shui C, Bah F, Lin P, Wah S, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications *Bauhinia variegata* var . *variegata* trypsin inhibitor : From isolation to potential medicinal applications. Biochem Biophys Res Commun. 2010;396(4):806-11.
28. Carolina D, Betancurt|| P, Gomez Barrera|| M, Luis E, Castillo P. Artículos de investigación original Antibacterial activity, determination of total polyphenols by Folin-Ciocalteu and toxicity in Artemia salina of plant species Bauhinia variegata. Vol. 5, Hechos Microbiol. 2014.
29. Frankish N, Menezes FDS, Mills C. Enhancement of Insulin Release from the β - Cell Line INS-1 by an Ethanolic Extract of *Bauhinia variegata* and Its Major Constituent Roseoside. Endocrinology, 2010;4-6.
30. Corsi AK, Wightman B. y Chalfie M. Una ventana transparente a la biología: una introducción a *Caenorhabditis elegans*, WormBook , ed. La comunidad de investigación de *C. elegans* , WormBook, doi / 10.1895 / wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org> .

31. Sanchez Mora RM, Medina Cruz VA, Téllez Dimaté BC. Glucose and inulin: *Caenorhabditis elegans* a model of diabetes. *Revista Med Crave* Volume 2 (2) 57 - 59, 2018.
32. Gonzalez L. Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Witheringia coccoloboides* sobre agregados de α -sinucleína en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans*. Repositorio UNAL 2018
33. Galina M, Ortiz M, Guerrero M. Estrés oxidativo y antioxidantes. *Revista habanera de ciencias médicas* Vol. 12. 2020.
34. Calderón Salinas J, Muñoz Reyes E, Quintanar Escorza M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus *Revista de educación bioquímica*, vol. 32, 2013
35. Maldonado M, Camargo G, Ramirez M, Hernandez A, Hernandez L. El organismo modelo *Caenorhabditis elegans* en la evaluación de fitoquímicos como antioxidantes. XII Encuentro Participación de la mujer en la ciencia, 2016
36. Modh KM, Parmar PT, Panigrahi B, Anand IS, Patel CN. Pharmacognostical and Phytochemical Evaluation of Leaves of *Bauhinia variegata* Linn . *Pharmacogn J*. 2011;3(24):45-9.
37. MSc. Maby M. Martínez, MSc. Diana M. Ocampo, BSc. Jhon H. Galvis, Andrea Valencia. Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanolicos de *Bauhinia variegata* (Fabaceae). *Revista cubana de Medicina*, 2011
38. Schmidt MEP, Pires FB, Bressan LP, Da Silva FV, Lameira O, Da Rosa MB. Some triterpenic compounds in extracts of *Cecropia* and *Bauhinia* species for different sampling years. *Brazilian J Pharmacogn* [Internet]. 2018;28(1):21-6.
39. Scarlet D. *J Chem Inf Model*. Aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la *Bauhinia variegata l.* biodirigido por ensayos de inhibicion sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa”. *Revista venezolana de medicina*. 2013;53(9):1689-99.
40. Raj Kapoor B, Jayakar B, Murugesh N. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton’s ascitic lymphoma. *J Ethnopharmacol*. 1 de noviembre de 2003;89(1):107-9.
41. Kulkarni YA, Garud MS. ScienceDirect *Bauhinia variegata* (*Caesalpiniaceae*) leaf extract: An effective treatment option in type I and type II diabetes. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2016;83:122-9.

42. Tripathi AK, Gupta PS, Singh SK. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of *Bauhinia variegata* flower extract. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;19(March):101142.
43. Chu Q, Jia R, Chen W, Liu Y, Li Y, Ye X, et al. Purified Tetrastigma hemsleyanum vines polysaccharide attenuates EC-induced toxicity in Caco-2 cells and *Caenorhabditis elegans* via DAF-16/FOXO pathway. *Int J Biol Macromol*. 2019;
44. Farias-pereira R, Kim E, Park Y. Cafestol increases fat oxidation and energy expenditure in *Caenorhabditis elegans* via DAF-12-dependent pathway. *Food Chem*. 2020;307(October 2019):125537.
45. Informe mundial sobre la diabetes. Organización Mundial de la Salud. 2020
46. Toscano N. OPS/OMS | Día Mundial de la Diabetes 2019. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2020
47. Hostettmann K, Gupta M, Mutis de Serna O. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología; 2008.
48. Ortiz H. F., W. F. Sánchez, J. Méndez A. & E. Murillo P.: Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms: Contribución de sus flavonoides en esta actividad. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*. 33(127): 183-191, 2009. ISSN 0370-3908.
49. Dhale DA. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Bauhinia variegata* Linn. *J Ecobiotechnology* [Internet]. 2011;3(9):4-07. Disponible en: [http://journal-ecobiotechnology.com/Tripathi AK, Gupta PS, Singh SK. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of *Bauhinia variegata* flower extract. *Biocatal Agric Biotechnol* \[Internet\]. 2019;19\(March\):101142.](http://journal-ecobiotechnology.com/Tripathi AK, Gupta PS, Singh SK. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of Bauhinia variegata flower extract. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. 2019;19(March):101142.)
50. Heidy F. Ortiz , Wilmer F. Sánchez, John Méndez A. & Elizabeth Murillo P. Ortiz. Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri harms*: contribución de sus flavonoides en esta actividad. *Rev Acad. Colomb. Cienc*. 33(127): 183-191, 2009. ISSN 0370-3908.
51. Escorcía W, Ruter DL, Nhan J, Curran SP. Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *J Vis Exp*, 2018;(March):1-6.

52. Science N, Kumar A, Info A, Anand V, Dubey RC, Goel KK. Evaluation of antioxidant potential of alcoholic stem bark extracts of *Bauhinia variegata* Linn. *Journal of Applied and Natural Science*, 2019;11(1):235-9.