



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de la AMPK en un modelo *in vivo* de diabetes”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

JUAN MIGUEL MENDOZA BELLO

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. MÓNICA ESPINOZA ROJO**
CODIRECTOR DE TESIS: **DR. MIGUEL ÁNGEL MENDOZA CÁATALAN**

CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GRO., ENERO DE 2017.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

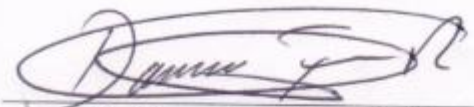
APROBACIÓN DE TESIS

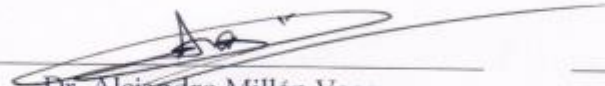
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 30 días del mes de junio de dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel de especies reactivas de oxígeno y fosforilación de la AMPK en un modelo *in vivo* de diabetes", presentada por el alumno Juan Miguel Mendoza Bello, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.


El Comité Tutorial



Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis

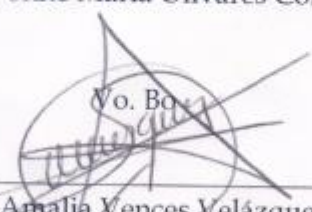

Dr. Napoleón Navarro Tito


Dr. Donaciano Flores Robles


Dr. Alejandro Millán Vega


Dra. Ivonne Maria Olivares Corichi


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Unidad
Académica de Ciencias Químico Biológicas


Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Génómica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica y Estrés oxidativo de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, y en colaboración con Laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) “Manuel Velasco Suárez” de la S.S.A., Ciudad de México.

Bajo la dirección de la

Dra. Mónica Espinoza Rojo

y

La codirección del

Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán

La asesoría de

Dr. Alejandro Millán Vega

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Napoleón Navarro Tito

Dra. María Ivonne Olivares Corichi

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Juan Miguel Mendoza Bello, recibió beca del CONACYT.

Agradecemos el apoyo otorgado por el FOMIX-CONACYT GUERRERO, para la difusión de los resultados del presente estudio.

Agradecimientos

A mis padres, la Profa. Martha Mireya Bello Isidro y al Ing. Juan Mendoza Pablo, que durante toda mi vida nunca han dejado de apoyarme, todo lo que hago es gracias a ustedes, a la educación que me brindaron. Todo lo que soy es por ustedes.

A Josefina Atrisco, mi compañera de mi vida, el amor de vida, esto es de los dos.

Te amo/Lo sé.

A mis hermanos, Abdel e Idahir, por todo lo que pasamos juntos, porque al final siempre estaremos juntos y no pude pedir mejores hermanos que ustedes.

A la Dra. Mónica Espinoza, gracias por creer en mí y por darme la oportunidad para seguir formándome como investigador, nunca terminaré de agradecerle.

A todos los del laboratorio de Biología Molecular y Genómica, “Los Wistar”, Martha, Raúl, Yale, Dulce, Mayra, Brenda, Sandy, Oscar y Carlos, y a los que ya pasaron por el laboratorio, por hacer más ameno el trabajo, son mi segunda familia.

Al Laboratorio de Bioquímica y Estrés Oxidativo de la Dra. Ivonne, por el apoyo para realizar parte de la tesis.

A la Dra. Penelope, Nara e Iván, por todo el apoyo durante el tiempo que estuve en su laboratorio.

A la Dra. Gloria, por los consejos y aportaciones como mi profesora de seminario, todo me ayudo para seguir creciendo como investigador.

A mis compañeros de la Maestría.

A mis asesores, la Dra. Ivonne, Dr. Miguel Ángel, Dr. Alejandro, Dr. Napoleón y Dr. Donaciano, sus aportaciones fueron muy valiosas.

A todos mis profesores del posgrado.

Muchas Gracias

“No existe lo desconocido, solo lo temporalmente oculto”

Indice

I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	3
IV. Material y métodos	6
V. Resultados	9
VI. Discusión	14
VII. Referencias	18

I. Resumen

La hiperglucemia en la diabetes se asocia con el daño a largo plazo y disfunción de órganos como, ojos, riñón y corazón. La hiperglucemia genera un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y disminución de antioxidantes endógenos, generando estrés oxidativo. El estrés oxidativo daña a lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN, además disminuye la activación de vías de señalización implicadas en la regulación de la glucosa, como la vía de la insulina y de la AMPK. Se ha reportado que los antioxidantes exógenos, pueden regular la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno y por ende las complicaciones derivadas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue, evaluar el efecto del extracto de ajo envejecido sobre las especies reactivas de oxígeno y la fosforilación de la AMPK en ratas diabéticas administradas con 60 mg/kg de estreptozotocina. Se administró diariamente extracto de ajo envejecido en dosis de 200 y 300 mg/kg y metformina en 100 mg/kg por 28 días. Posteriormente se obtuvo el músculo para medir las especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo y fosforilación de la AMPK por Western blot. El nivel de glucosa disminuyó 40.9% en ratas no diabéticas tratadas con 300 mg/kg de extracto de ajo envejecido. En ratas diabéticas, el tratamiento con diferentes dosis de extracto de ajo envejecido (200 mg/kg – 96.6%, 300 mg/kg - 54.6%) y la combinación con metformina (64.1%), inducen disminución de especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, el tratamiento con 200 mg/kg del antioxidante aumenta la fosforilación de la AMPK en ratas diabéticas. Concluyendo que el extracto de ajo envejecido disminuye las especies reactivas de oxígeno dependiente de la dosis. La dosis de 200 mg/kg de extracto de ajo envejecido aumenta la fosforilación de AMPK en ratas diabéticas.

Palabras clave: diabetes, AMPK, especies reactivas de oxígeno, extracto de ajo envejecido, metformina.

II. Abstract

Hyperglycemia in diabetes is associated with long-term damage and dysfunction of organs such as eyes, kidney and heart. Hyperglycemia generates an increase in the production of reactive oxygen species and a decrease in endogenous antioxidants, generating oxidative stress. The oxidative stress damages lipids, carbohydrates, proteins and DNA, and decreases the activation of signaling pathways involved in glucose regulation, such as the insulin and AMPK pathways. It has been reported that exogenous antioxidants can regulate the uncontrolled production of reactive oxygen species and so the complications derived. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of aged garlic extract on reactive oxygen species level and phosphorylation of AMPK in diabetic rats administered with 60 mg/kg streptozotocin. Aged garlic extract was given daily at doses of 200 and 300 mg/kg and metformin at 100 mg/kg for 28 days. The muscle was then obtained to measure reactive oxygen species level by flow cytometry and phosphorylation of AMPK by Western blotting. The glucose level decreased 40.9% in non-diabetic rats treated with 300 mg/kg of aged garlic extract. In diabetic rats, the treatment with different doses of aged garlic extract (200 mg/kg - 96.6%, 300 mg/kg - 54.6%) and combination with metformin (64.1%) induce a decrease of reactive oxygen species. On the other hand, treatment with 200 mg/kg of the antioxidant increases the phosphorylation of AMPK in diabetic rats. Concluding that the aged garlic extract decreases reactive species of oxygen level dependent on the dose. The dose of 200 mg/kg of aged garlic extract increased the phosphorylation of AMPK in diabetic rats.

Key words: diabetes, AMPK, reactive oxygen species, aged garlic extract, metformin.

III. Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad que se caracteriza por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina, la cual es una hormona de 5.8 kD de peso molecular, sintetizada en las células β del páncreas, y que regula los niveles de glucosa sanguínea (Das and Elbein, 2006), principalmente en células de tejido muscular, cardíaco y adiposo (Watson and Pessin, 2001). El efecto de la insulina se basa en la activación de su receptor, para activar una cascada de señalización que induce la translocación de vesículas que contienen los transportadores de glucosa dependientes de insulina 4 (GLUT4), desde el espacio intracelular hasta la membrana plasmática. GLUT4 es el principal y más abundante transportador en tejido muscular, (Lin and Sun, 2010; Rea and James, 1997; Valko *et al.*, 2007). La translocación de GLUT4 a la membrana plasmática también puede llevarse a cabo por la activación de la vía de la cinasa dependiente de AMP (AMPK), la cual es independiente de la acción de la insulina (Koistinen *et al.*, 2003). AMPK es una proteína formada por 3 subunidades, α , β y γ , se activa por fosforilación en el residuo Thr¹⁷² cuando aumentan los niveles de AMP en relación a ATP, debido a que el AMP se une a la subunidad γ provocando un cambio conformacional de la proteína, que expone a la subunidad α para que sea fosforilada por LKB1 en Thr¹⁷² (Cheung *et al.*, 2000). Esta cinasa es activada durante ejercicio prolongado, ya que durante la contracción muscular se degrada ATP y aumentan las concentraciones de AMP, que se unirá a AMPK para inducir su activación (Morales-Alamo and Calbet, 2016). Algunos fármacos hipoglucemiantes como la metformina inducen la activación de la AMPK, al inhibir al complejo 1 de la cadena transportadora de electrones, durante la fosforilación oxidativa (Owen *et al.*, 2000), lo que genera la disminución de ATP y aumenta el nivel de AMP (Kurth-Kraczek *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009).

Cuando la glucosa entra a la célula, ya sea por acción de la insulina o activación de la AMPK, inicia la glucólisis en el citoplasma y se forma piruvato. El piruvato entra a la mitocondria y se incorpora al ciclo de Krebs para generar nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y flavin adenina dinucleótido (FAD), que participan en la

fosforilación oxidativa para la producción de ATP. Una parte del oxígeno que es utilizado en la fosforilación oxidativa, es convertido a superóxido (O_2^-), especie reactiva de oxígeno (ERO) y precursor de otras EROs, como el radical hidroxilo (OH^-) y de especies no radicales, como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Evans *et al.*, 2002; Kamata and Hirata, 1999). En condiciones fisiológicas normales las células mantienen un equilibrio entre la generación y eliminación de EROs por el sistema antioxidante endógeno, constituido por las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, entre otros (Lee *et al.*, 2004), y por antioxidantes endógenos no enzimáticos como la vitamina C y E, los carotenoides y los flavonoides (Valko *et al.*, 2007).

Sin embargo, cuando existe hiperglicemia, aumentan los niveles globales intracelulares de EROs y disminuye la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, por lo que la célula entra en una condición de estrés oxidativo (Valko *et al.*, 2007). Así, las EROs que no fueron neutralizadas por el sistema antioxidante, pueden oxidar a macromoléculas, modificando proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA, generando daño celular, activando vías sensibles al estrés y generando disfunción en tejidos y órganos (Styskal *et al.*, 2012; Valko *et al.*, 2007) especialmente ojos, riñones y corazón, generando complicaciones diabéticas macro y microvasculares (Association, 2016). Se ha reportado que algunas cinasas involucradas en las complicaciones diabéticas, son sensibles a estrés oxidativo, tal es el caso de la cinasa MAP p38 (p38 MAPK) y la cinasa c-Jun N-terminal/proteína cinasa (JNK/SAPK) (Evans *et al.*, 2002). La sobreactivación de p38 MAPK por estrés oxidativo, genera la hiperfosforilación de residuos Ser^{307} en el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), cuando normalmente se fosforilan en residuos de Tyr^{608}/Tyr^{028} , esto disminuye la habilidad de asociarse con el receptor de insulina (IR) (Archuleta *et al.*, 2009; Pitocco *et al.*, 2013) provocando un deterioro en la señalización. Por otra parte p38 MAPK es capaz de fosforilar al inhibidor de NF κ B (I κ B), permitiendo que NF κ B se transloque al núcleo para activar la expresión de genes como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG) y citocinas proinflamatorias, genes involucrados en la angiogenesis e inflamación en la retina (retinopatía) y riñón (nefropatía) durante la diabetes (Evans *et al.*, 2002). Anteriormente se mencionó que, durante el estrés

oxidativo, ocurre la oxidación de lípidos (peroxidación lipídica), como producto de dicha peroxidación, se libera 4-hidroxinonanal (HNE), capaz de formar aductos covalentes con LKB1, inhibiendo la acción de esta cinasa, disminuyendo la fosforilación de la AMPK (Dolinsky *et al.*, 2009). Aunado a esto, se ha reportado que el aumento de las EROs es capaz de oxidar a la AMPK, específicamente en residuos *Cys*¹³⁰/*Cys*¹⁷⁴ de la subunidad α , que causa una disminución en la fosforilación de la *Thr*¹⁷² (Shao *et al.*, 2014). Por lo tanto ambas vías relacionadas con la homeostasis de glucosa son alteradas durante la diabetes, como consecuencia del estrés oxidativo. Los fármacos, como la insulina o la metformina, que regulan los niveles de glucosa sanguínea e inducen la entrada de glucosa a la célula (Coughlan *et al.*, 2014), también generan un aumento descontrolado de EROs, si no se controla la ingesta de glucosa. Siendo el estrés oxidativo un factor para la progresión de la diabetes, y debido a que no puede obviarse el tratamiento farmacológico, es importante el empleo de antioxidantes exógenos que neutralicen la concentración descontrolada de EROs.

Se ha planteado la utilización de plantas con potencial antioxidante con la finalidad de disminuir el efecto colateral del tratamiento farmacológico (Modak *et al.*, 2007). El Extracto de Ajo Envejecido (EAE), es un compuesto que tiene mayor capacidad antioxidante, en comparación con otras preparaciones, debido a que el envejecimiento provoca que los componentes antioxidantes y organosulfurados como la S-alilcisteína (SAC) y la mercaptocisteína se concentren, siendo más estables y con mayor efecto antioxidante (Colin-Gonzalez *et al.*, 2012). Este efecto antioxidante se ha reportado en modelos de ratas diabéticas, donde el tratamiento con EAE disminuye los niveles de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación de lípidos, en células del riñón e hígado (Thomson *et al.*, 2016). También se ha demostrado el efecto antioxidante de la SAC, para neutralizar las EROs en estudios *in vitro* y que esto es debido al grupo tiol localizado en su estructura química (Maldonado *et al.*, 2011). Por otra parte se ha observado que el tratamiento con EAE, tiene efecto anti-hiperglucemiante en un modelo *in vivo* de diabetes (Barragan-Bonilla *et al.*, 2013), y aumenta la expresión de genes de las enzimas antioxidantes (Thomson *et al.*, 2016) mediante la activación del factor de transcripción 2 asociado con el factor nuclear eritoride 2 (Nrf2) (Kalayarasan

et al., 2008). Por estas razones al EAE se le atribuyen efectos beneficiosos para tratar la diabetes.

Para profundizar en el efecto molecular del EAE, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antioxidante del EAE sobre las EROs y la fosforilación de la AMPK en tejido muscular de ratas diabéticas.

IV. Material y métodos

Modelo animal

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (n=4-12), entre 250-350 g de peso que fueron obtenidas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 6 grupos (Tabla 1). La diabetes experimental fue inducida con una inyección de 60 mg/kg de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por vía intraperitoneal. Después de 48 h del tratamiento con STZ se midieron los niveles de glucosa sanguínea utilizando tiras reactivas y el glucómetro OneTouch® (LifeScan, Pensilvania EUA). Las ratas fueron consideradas diabéticas cuando tuvieron una concentración de glucosa sanguínea mayor a 250 mg/dL. El tratamiento con extracto de ajo envejecido EAE (Kyolic, California, EUA) y metformina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (Tabla 1) se aplicó cada 24 h durante 28 días por vía oral, mediante una cánula gástrica. Los animales tuvieron libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron respetando los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 sobre las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Al término del tratamiento los animales fueron anestesiados con Pentobarbital (Cheminova, Edo. De México, México) vía intraperitoneal y sacrificados por decapitación, posteriormente se extrajo el tejido muscular de las extremidades posteriores.

Tabla 1. Características de los grupos de experimentación

Grupo	Condición y tipo de tratamiento del grupo
Control sano	Ratas normales (Ctrl)
Control sano con tratamiento	Ratas con tratamiento con EAE (200 mg/kg) (C-200)

Control sano con tratamiento	Ratas con tratamiento con EAE (300 mg/kg) (C-300)
Diabético	Ratas diabéticas [Inducción de diabetes con STZ (60 mg/kg)] (D)
Diabético con tratamiento	Ratas diabéticas tratadas con EAE (200 mg/kg) (D-200)
Diabético con tratamiento	Ratas diabéticas tratadas con extracto de ajo envejecido (300 mg/kg) (D-300)
Diabético con metformina	Ratas diabéticas tratadas con metformina (100 mg/kg) (D-Met)
Diabético con tratamiento y metformina	Ratas diabéticas tratadas con EAE (200 mg/kg) y metformina (D-200-Met)

Determinación de los niveles de EROs en tejido muscular

La detección de EROs se realizó utilizando 50 mg de tejido muscular, homogenizados en 1000 μ l de PBS. El homogenizado se centrifugó por 5 min a 10000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 1000 μ l de tripsina (TrypLE, Invitrogen, California, EUA) y se incubó a 37°C por 20 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Se tomaron 200 μ l de la muestra, y se mezclaron con 5 μ M del Kit *CellRox Green Reagent* (Invitrogen, California, EUA) y se incubó a 37°C por 30 min. La muestra se analizó en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Beckton Dickinson, USA). Los datos fueron normalizados con la concentración de proteína total mediante el método de Bradford.

Determinación de los niveles de MDA en plasma

El daño a lípidos en plasma por EROs se determinó mediante el método de 1-metil-2-fenilindole (MPI). Se obtuvo plasma de los grupos (n=2-6) después de la inducción de DM por STZ y al finalizar el tratamiento. Se ocuparon 50 μ l de plasma. Se le adicionó 50 μ l de agua destilada, 650 μ l de MPI 10 mM y 150 μ l de HCl 37%. Posteriormente se incubó por 40 min a 45°C. Al término de la incubación, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se procedió a leer las absorbancias a una longitud de onda de 586 nm. Como estándar se utilizó 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (malondialdehído bis). Los resultados obtenidos se reportaron en μ M.

Cuantificación de grupos carbonilos en plasma

Del plasma obtenido previamente se tomaron 50 μ l y se le adicionó 500 μ l de DNPH 10 mM (2,4-dinitrofenilhidrazina + HCl 2.5 M). Como blanco, de cada muestra se tomaron 50 μ l y se le adicionó 500 μ l de HCl 2.5 M. Ambas muestras se incubaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz por una hora, agitando en intervalos de 15 min. Al término de la incubación se agregó 1000 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado, se disolvió con 1000 μ l de TCA al 2.5% y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. El precipitado se disolvió en 2 ml de etanol/acetato de etilo y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Se dejó secar por 5 minutos y posteriormente, el precipitado fue disuelta en 1000 μ l de guanidina 6M a pH 6.3 e incubado a 37°C por 10 min. Posterior a la incubación se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 370 nm. Los resultados obtenidos se ajustaron por mg de proteína total y se reportó como nmol de osazonas/mg de proteína.

Análisis de p-AMPK

Se lisaron 50 mg de tejido muscular con 500 μ l buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Desoxicolato de sodio, 5 mM EDTA y 50 mM HEPES, pH 7.5), suplementado con pirofosfato de sodio e inhibidores de proteasas. La muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 5 min, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 13200 rpm a 4°C por 10 min. La concentración de proteína total en el extracto fue determinada por el método de Bradford. Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% con 40 μ g de proteína total diluida en buffer de muestra (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.01% azul de bromofenol, 10% β -mercaptoetanol). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La detección de las proteínas se realizó utilizando anticuerpos primarios específicos para AMPK α 1/2 y p-AMPK α 1/2 (Thr172) (Santa Cruz, California, EUA). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch, Pensilvania, EUA). Los inmunocomplejos fueron revelados por quimioluminiscencia utilizando Luminata (Millipore, Massachusetts, EUA) y películas radiográficas. Los niveles de

proteína fueron calculados mediante análisis densitométrico de las bandas con el programa Image J.

Análisis estadístico

Se evaluaron diferencias respecto a los controles utilizando análisis de varianza (ANOVA) asociado a la Prueba de Tukey y se evaluó diferencias entre grupos con la prueba t Student. Los datos fueron graficados como media aritmética y error estándar utilizando el programa GraphPad Prism ® v5. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

V. Resultados

Efecto del EAE sobre los niveles de glucosa.

Para evaluar el efecto del EAE sobre los niveles de glucosa sanguínea, se determinó el nivel de glucosa en todos los grupos experimentales al momento de inducir STZ y 48 horas después de la inducción. Una vez que los animales fueron considerados diabéticos, fueron tratados por vía oral con EAE en dosis de 200 y 300 mg/kg y/o 100 mg/kg de metformina. Nuevamente se determinó el cambio en el nivel de glucosa al finalizar el tratamiento y se realizó la comparación entre grupos.

En lo que respecta a los grupos controles, el EAE en el grupo C-300 disminuyó significativamente los niveles de glucosa (40.9%) comparado con el grupo Ctrl. En el grupo D hubo un aumento significativo en el nivel de glucosa (35%) en comparación con el grupo Ctrl. En los grupos diabéticos con tratamiento con EAE, ninguna dosis (D-200, D-300) fue capaz de regular el nivel de glucosa. Por otra parte el tratamiento con metformina en el grupo diabético (D-Met) mostró una tendencia a disminuir los niveles de glucosa (Figura 1).

Estos resultados indican que la dosis de 300 mg/kg de EAE en ratas sanas tiene efecto hipoglucemiante, mientras que el tratamiento en los grupos diabéticos tanto en dosis

de 200 y 300 o en combinación con metformina no tiene efecto sobre los niveles de glucosa. Sin embargo en el grupo con tratamiento con metformina se observa una tendencia a disminuir los niveles de glucosa.

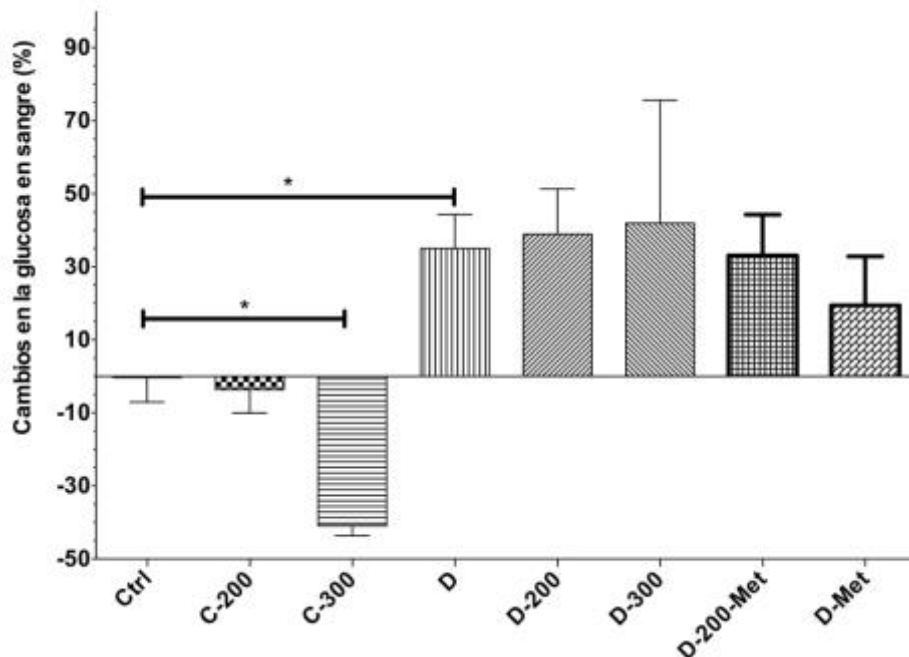


Figura 1. Efecto del EAE sobre los niveles de glucosa sanguínea de ratas diabéticas, después de 28 días de tratamiento. Se determinó el porcentaje de cambio en los niveles de glucosa en ratas Wistar, control (Ctrl), con tratamiento de 200 (C-200) y 300 (C-300) mg/kg de peso de EAE y ratas diabéticas inducidas con 60 mg/kg de STZ, (D), seguido de la administración de 200 (D-200) o 300 (D-300) mg/kg de EAE diariamente por 28 días y/o 100 mg/kg de metformina (D-200-Met, D-Met respectivamente). Los datos se muestran como los promedios del porcentaje de cambio en los los valores de glucosa sanguínea. * $p < 0.05$ con prueba de *t* student

Efecto del EAE sobre el nivel de EROs.

Se determinó el nivel de EROs por citometría de flujo en todos los grupos de estudio con la finalidad de determinar si la hiperglucemia aumenta el nivel de dichos radicales y si el tratamiento con EAE reduce los niveles de EROs, en tejido muscular.

Se observó que en el grupo D, el nivel de EROs aumenta significativamente (40.1%) en comparación con el grupo Ctrl. Por otro lado el tratamiento con EAE en los grupos D-200 y D-300 disminuye significativamente los niveles de EROs (43.5% y 85.4%, respectivamente) de forma dependiente de la dosis en comparación con el grupo D.

En el grupo con tratamiento combinado metformina-antioxidante (D-200-Met) se observó una disminución significativa de las EROs (79.5%), comparado con el grupo D. En el grupo experimental D-Met el nivel de EROs tiende a aumentar en comparación con el grupo D, sin encontrar diferencia significativa (Figura 2).

Estos resultados indican que el estado de hiperglicemia aumenta los niveles de EROs y que el tratamiento con EAE es eficaz para disminuir este aumento de manera dependiente de la dosis, así como la combinación de EAE y metformina también disminuye los niveles de EROs.

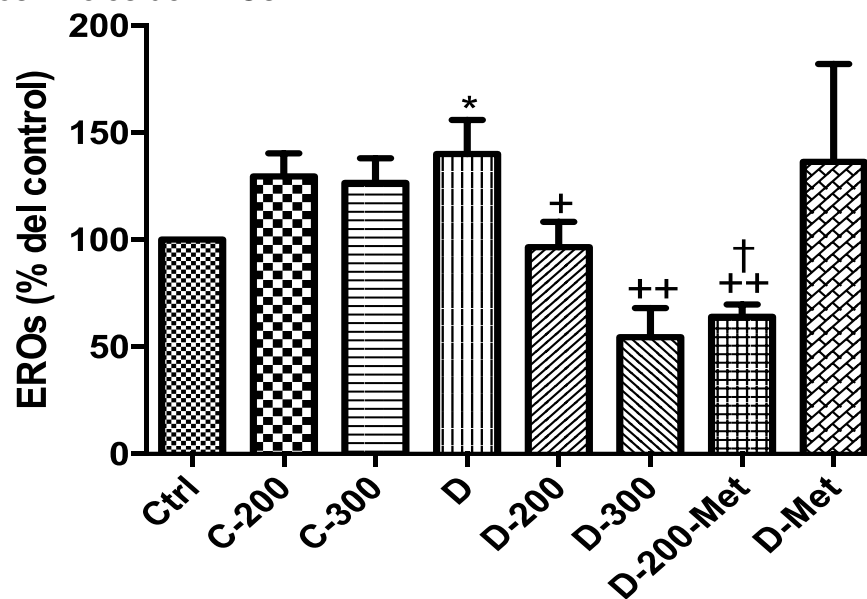


Figura 2. Efecto del EAE sobre los niveles de las EROs en tejido muscular. Se determinó los niveles de EROs por citometría de flujo después de 20 días de tratamiento con EAE y/o metformina en tejido muscular, utilizando el kit CellRox. Ctrl; C-200; C-300; D; D200; D300; D-200-Met; D-Met. Los datos se grafican en porcentaje de Intensidad de Fluorescencia sobre μg de proteína total. Los datos fueron normalizados con proteína total, determinada por la técnica de Bradford. Todas las mediciones se hicieron por duplicado. Los datos se expresan como la media \pm error estandar. * $p < 0.05$, en comparación con el grupo C; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, en comparación con el grupo D; † $p < 0.05$, en comparación con el grupo D-200 con prueba de t student.

Efecto del EAE sobre los niveles de MDA.

Para comprobar que el aumento de EROs en los diferentes grupos experimentales ocasiona daño a los lípidos y si el EAE disminuye este daño, se midieron los niveles de MDA en plasma de ratas diabéticas al inicio y final del tratamiento.

Los niveles de MDA no aumentan en los grupos diabéticos en comparación con el grupo control (Ctrl) antes de iniciar el tratamiento con el antioxidante, sin embargo, al finalizar el tratamiento los niveles de MDA tienden a disminuir (Figura 3).

Esto indica que los niveles de EROs no fueron suficientes para generar un daño oxidativo significativo en los lípidos o que posiblemente el número de muestras no fue suficiente para encontrar diferencias entre los grupos.

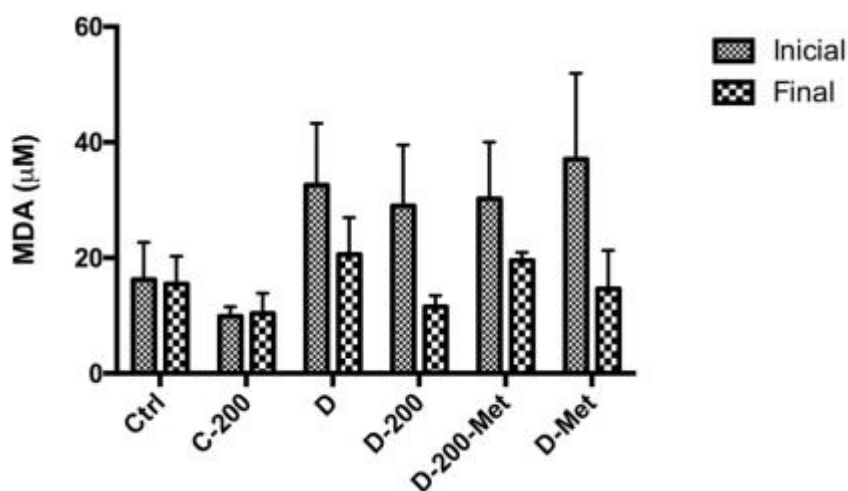


Figura 3. Efecto del EAE sobre los niveles de MDA en plasma sanguíneo de ratas diabéticas. Para determinar si existía daño a lípidos de membrana como indicativo de estrés oxidativo, se determinó el nivel de MDA al inicio y después de 28 días de tratamiento con EAE y/o metformina en plasma sanguíneo por espectrofotometría. Ctrl; C-200; D; D-200; D-200-Met; D-Met. Los datos se expresan como la media \pm error estándar. t de student.

Efecto del EAE sobre el nivel de carbonilos en plasma.

Para conocer si el aumento de EROs está generando un daño celular a nivel de proteínas, se midió el nivel de carbonilos en plasma de ratas diabéticas con y sin tratamiento con EAE, al inicio y al final del tratamiento

Se encontró que el aumento de EROs derivado de la hiperglicemia no aumenta los niveles de carbonilos y que al finalizar el tratamiento solo la dosis de 200 mg/kg en ratas control disminuye significativamente los niveles de carbonilos (Figura 4).

Con esto concluimos que el EAE en dosis de 200 mg/kg disminuye el nivel de carbonilos en ratas control.

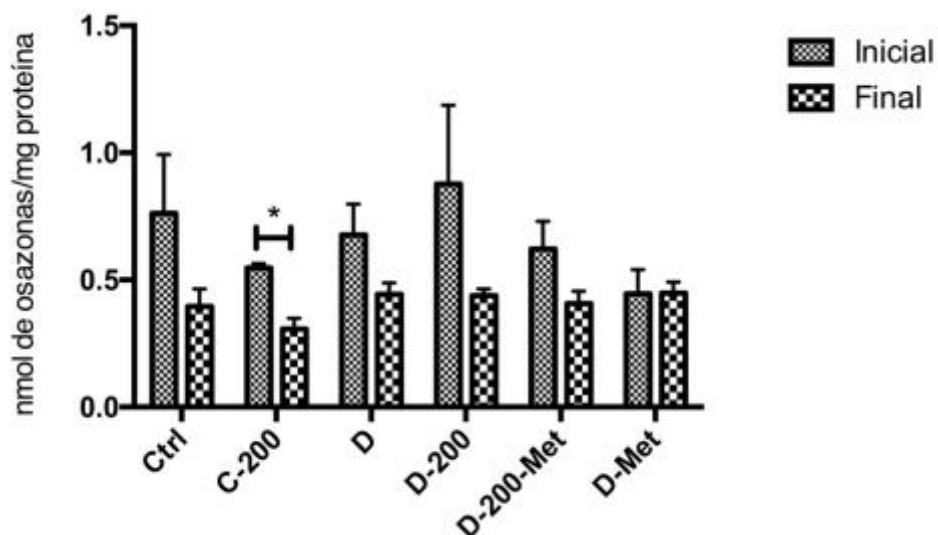


Figura 4. Efecto del EAE sobre los niveles de carbonilos en plasma sanguíneo de ratas diabéticas. Para determinar el daño a proteínas por las EROs se midió el nivel de carbonilos al inicio y después de 28 días de tratamiento con EAE y/o metformina en plasma sanguíneo. Ctrl; C-200; D; D-200; D-200-Met; D-Met. Los datos se expresan como la media \pm error estándar. * $p < 0.05$

Efecto del EAE sobre la fosforilación de AMPK.

Cuando existe un aumento de EROs, la fosforilación de la AMPK disminuye, ya que esta puede oxidarse o su activador, LKB1, bloquearse por los componentes liberados durante la lipoperoxidación. Para determinar si el efecto antioxidante del EAE y/o metformina aumenta la fosforilación de la AMPK en tejido muscular de ratas diabéticas se determinó la fosforilación de la AMPK por Western blot.

En el grupo D se observó una tendencia a disminuir la fosforilación de la AMPK. Por otra parte, en el grupo D-200 se encontró un aumento significativo en la fosforilación de la AMPK, pero dicha fosforilación se encuentra disminuida en los grupos D-300 y D-200-Met, todos en comparación con el grupo D. La fosforilación de la AMPK aumenta significativamente en el grupo D-Met (Figura 3).

Estos resultados demuestran que la condición diabética tiende a disminuir la fosforilación de la AMPK y el tratamiento de 200 mg/kg de EAE revierte este efecto. Por otra parte, el tratamiento de 300 mg/kg y el tratamiento combinado de 200 mg/kg de EAE y 100 mg/kg de metformina disminuyen la fosforilación de la AMPK en los grupos diabéticos.

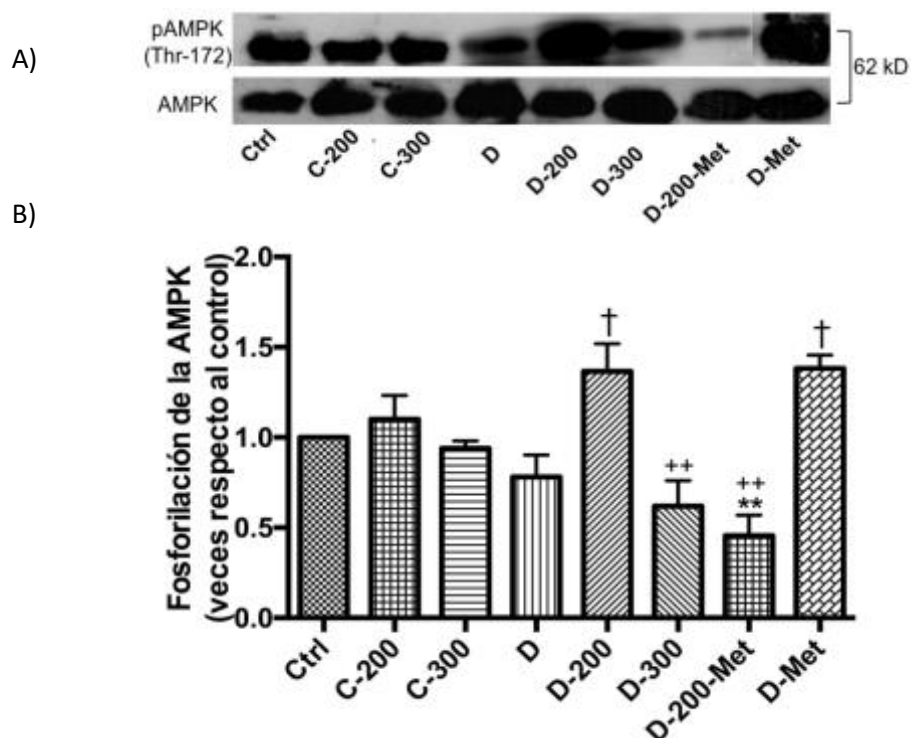


Figura 2. Efecto del EAE sobre la fosforilación de AMPK en tejido muscular. Para determinar el efecto del EAE sobre la fosforilación de AMPK se realizó el Western blot para la detección de pThr-172 de la AMPK, el control de carga se realizó mediante la detección de AMPK total. A) Western blot del efecto del EAE sobre la fosforilación de la AMPK. B) Comparaciones del nivel de fosforilación de AMPK en tejido muscular de los diferentes grupos de experimentación. Los datos se expresan como la media \pm error estándar. † $p < 0.05$, en comparación con el grupo D; ++ $p < 0.01$, en comparación con el grupo D-200; *** $p < 0.01$, en comparación con el grupo D-Met. con ANOVA y test de Tukey.

VI. Discusión

El EAE tiene efecto hipoglucemiante en ratas no diabéticas

En el presente estudio se determinó que el EAE tiene efecto hipoglucemiante en dosis de 300 mg/kg en el grupo control sin diabetes, similar a lo encontrado por Eidi *et al.*, en el 2006 y por Thomson *et al.*, en el 2006 donde observaron un efecto

hipoglucemiante utilizando extractos de ajo y ajo crudo. Se ha especulado que el ajo puede estimular la secreción de insulina de las células β del páncreas, aunque se desconoce el mecanismo molecular, se ha determinado en estudios *in vivo* que el tratamiento con extractos de ajo aumenta los niveles de insulina sérica (Eidi *et al.*, 2006), lo que podría explicar su efecto hipoglucemiante. Otro mecanismo que puede estar involucrado en la regulación de los niveles de glucosa es que el EAE aumenta la expresión de los genes de los transportadores de glucosa, GLUT1 (Espinoza-Rojo *et al.*, 2014), GLUT3 (De la Cruz Concepción *et al.*, 2014) y GLUT4 (Barragan-Bonilla *et al.*, 2013) en diferentes tejidos. Por otra parte en los grupos diabéticos el tratamiento con EAE no tiene efecto sobre los niveles de glucosa y de igual manera el tratamiento convencional y combinado. Lo anterior es similar a lo observado por Jankyova *et al.*, (2016), donde al utilizar la metformina en combinación con Pycnogenol, un antioxidante, no encontró efecto en los niveles de glucosa. Esto puede ser debido a que el nivel de glucosa detectado en los animales diabéticos incluidos en la presente investigación fue más de 600 mg/dL, lo que dificulta la acción de diferentes fármacos, e inclusive de los antioxidantes, por lo que el EAE no es capaz de contrarrestar esta condición (Pessler-Cohen *et al.*, 2006; Pessler *et al.*, 2001). Lo que también explica el efecto no significativo que tuvo la metformina sola o en combinación con EAE en los grupos diabéticos.

El EAE disminuye las EROs en tejidos muscular de ratas diabéticas

Cuando hay hiperglicemia se genera un estado de estrés oxidativo, donde los niveles de EROs se encuentran aumentados y la actividad antioxidante disminuida debido a una sobreactivación de la cadena transportadora de electrones por un aumento en la glucólisis (Afanas'ev, 2010). Considerando lo anterior, en el presente estudio y en concordancia con otros autores, encontramos que en los grupos diabéticos sin tratamiento existen niveles aumentados significativamente de EROs (Du *et al.*, 1999; Maiese, 2015). Sin embargo el tratamiento con EAE, indujo una disminución de EROs de manera dependiente de la dosis (D-200 y D-300), lo que nos indica un efecto antioxidante (Borek, 2001; Colin-Gonzalez *et al.*, 2012; Dillon *et al.*, 2003). Este efecto se le atribuye principalmente a la SAC, que es un componente activo mayoritario del

EAE (Colin-Gonzalez *et al.*, 2012), se ha reportado que la SAC se une y neutraliza moléculas de hidroxilo, a través de la unión de su grupo tiol contenido en su estructura química (Maldonado *et al.*, 2011).

El tratamiento combinado de EAE y metformina tuvo un mejor efecto disminuyendo las EROs, debido a que a la metformina se le ha atribuido efecto antioxidante aunado al efecto antioxidante del EAE. La metformina activa a la AMPK, la cual activa a PGC-1 α , que es un coactivador del factor Nrf2, el cual es aumenta la expresión de enzimas antioxidantes endógenas (Cantó and Auwerx, 2010); También se ha reportado que la metformina aumenta la actividad de la enzimas antioxidantes, catalasa y superóxido dismutasa, y del glutatión en modelos diabéticos inducidos con alloxan, aunque el mecanismo no es conocido aun (Chukwunonso Obi *et al.*, 2016).

Efecto del EAE sobre el daño generado por EROs a lípidos y proteínas.

La peroxidación de ácidos grasos es utilizado como marcador de estrés oxidativo debido al daño que ocasiona las EROs a los lípidos de la membrana celular (Haugaard, 1968). Se ha reportado que modelos de hiperglucemia tanto *in vitro* e *in vivo* existe un aumento en la lipoperoxidación y que a su vez aumenta las concentración de malondialdehido y 4-hidroxinonenal, productos finales de la lipoperoxidación (Chukwunonso Obi *et al.*, 2016; Dolinsky *et al.*, 2009), también se encuentra aumentada la concentración de carbonilos derivado de la oxidación de proteínas (Ruskovska and Bernlohr, 2013). En nuestro de estudio no encontramos aumento significativo de los niveles de MDA, ni en los niveles de carbonilos, pero si encontramos la tendencia a aumentar en condiciones diabéticas, con y sin tratamiento con EAE y/o metformina, lo que nos habla que en algunos animales del estudio si hay estrés oxidativo y en otros tal vez por sus defensas antioxidantes no hay presencia de daño.

El EAE aumenta la fosforilación de la AMPK en diabetes

La AMPK es un regulador del metabolismo celular, juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Carling, 2004). En los últimos años se ha

descrito como blanco terapéutico en diferentes patologías, como la diabetes, obesidad y el cáncer (Kim *et al.*, 2007). La activación de la AMPK propicia la captación de glucosa por la célula, debido a la translocación de los GLUT4 a la membrana plasmática celular (Kurth-Kraczek *et al.*, 1999). Nosotros encontramos que la fosforilación de la AMPK tiende a disminuir en el grupo diabético, este resultado es similar a lo encontrado por Yang *et al.*, (2014), al observar que la fosforilación de la AMPK se disminuye en ratas diabéticas inducidas con STZ. Lo anterior puede ser debido a que la cinasa es oxidada por las EROs en residuos Cys¹³⁰/Cys¹⁷⁴ de la subunidad α (Shao *et al.*, 2014), esto genera que AMPK no se fosforile.

La utilización de antioxidantes exógenos aumenta la fosforilación de la AMPK (Yang *et al.*, 2014). En nuestros resultados encontramos que la dosis de EAE de 200 mg/kg aumenta la fosforilación de AMPK por lo que coincide con la disminución de EROs, con la misma dosis de tratamiento antioxidante. Sin embargo, el tratamiento combinado de 200 mg/kg de EAE y 100 mg/kg de metformina disminuye la fosforilación de la AMPK, este efecto puede ser debido al potencial antioxidante combinado y que esto sea suficiente para evitar la activación de moléculas sensibles a estrés, como p38 y JNK, que estarían bloqueando la vía de señalización de la insulina, por lo que esta vía de la insulina ejercerá su efecto adecuadamente captando glucosa y por consiguiente el aumento de los niveles de ATP en relación a AMP y así evitando la activación de la AMPK (Choi *et al.*, 2004).

En conclusión, ambas dosis de EAE y en combinación con metformina ejercen efecto antioxidante disminuyendo las EROs en animales diabéticos, pero solo la dosis de 200 mg/kg induce un aumento en la fosforilación de la AMPK, aunque no es suficiente para inducir un efecto hipoglucemiante, ya que el nivel de glucosa en circulación disminuye con el tratamiento solo en condiciones normales.

VII. Referencias

Afanas'ev, I. (2010). Signaling of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3. 361–373.

Archuleta, L., Lemieux, M., Saengsirisuwan, V., Teachey, K., Lindborg, A., Kim, S., *et al.* (2009). Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK. *Free Radical Biology and Medicine*. 47. 1486–1493.

Barragan-Bonilla, M., Rodríguez-Ruíz, H., Espinoza-Rojo, M., (2013). *Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel del mRNA de GLUT1 y GLUT4 en un modelo in vivo de diabetes mellitus*. Tesis de licenciatura no publicada. Universidad Autónoma de Guerrero.

Borek, C. (2001). Antioxidant Health Effects of Aged Garlic Extract. *The Journal of Nutrition*. 131. 1010S–1015S.

Cantó, C., Auwerx, J. (2010). AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67, 3407–3423.

Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*. 29. 18–24.

Cheung, C., Salt, P., Davies, P., Hardie, G., Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochemical Journal*. 346. 659–669.

Choi, B., Wha, D., Park, S. (2004). The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. *Life Sciences*. 75. 2653–2664.

Chukwunonso, B., Chinwuba, T., Okpashi, E., Nonye Igwe, C., Olisah Alumanah, E. (2016). Comparative Study of the Antioxidant Effects of Metformin, Glibenclamide, and Repaglinide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*. 2016. 1-5.

Colin-Gonzalez, L., Santana, A., Silva-Islas, A., Chanez-Cardenas, E., Santamaria, A., Maldonado, D. (2012). The Antioxidant Mechanisms Underlying the Aged Garlic Extract- and S-Allylcysteine-Induced Protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012. 1-16.

Coughlan, A., Valentine, J., Ruderman, B., Saha, K. (2014). AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes?. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therap*. 7. 241–253.

Das, S., Elbein, S., (2006). The Genetic Basis of Type 2 Diabetes. *Cellscience*. 2. 100–131.

De la Cruz Concepción, B., Barrera Navarrete, P., Espinoza-Rojo, M. (2014). *Efecto del extracto de ajo envejecido sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en cerebro de ratas diabéticas*. Tesis de licenciatura no publicada. Universidad Autónoma de Guerrero.

Dillon, A., Burmi, S., Lowe, M., Billington, D., Rahman, K. (2003). Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sciences*. 72. 1583–1594.

Dolinsky, V., Chan, A., Robillard Frayne, I. (2009). Resveratrol Prevents the Prohypertrophic Effects of Oxidative Stress on LKB1. *Circulation*. 119. 1643–1652.

Du, X., Stocklauser-Färber, K., Rösen, P. (1999). Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase?. *Free Radical Biology and Medicine*. 27. 752–763.

Eidi, A., Eidi, M., Esmaeili, E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 13. 624–629.

Espinoza-Rojo, M., Gómez, C., Parra Abarca, J. (2014). Glucose Transporter 1 Expression Is Regulated by Aged Garlic Extract during Cerebral Ischemia. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2. 899–905.

Evans, J., Goldfine, I., Maddux, B., Grodsky, G. (2002). Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. 23. 599–622.

Haugaard, N. (1968). Cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Physiological Reviews*. 48. 311–373.

Jankyova, S., Rubintova, D., Janosikova, L., Panek, P., Foltanova, T., Kralova, E. (2016). The Effects of Pycnogenol® as Add-on Drug to Metformin Therapy in Diabetic Rats: Add-on Therapy with Pycnogenol® in Diabetes. *Phytotherapy Research*. 30. 1354-1361.

Kalayarasan, S., Sriram, N., Sureshkumar, A., Sudhandiran, G. (2008). Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*. 28. 908-919.

Kamata, H., Hirata, H. (1999). Redox Regulation of Cellular Signalling. *Cell. Signal*. 11, 1–14.

Kim, J., Jung, N., Son, H., Kim, R., Ha, Y., Park, G., *et al.* (2007). Antidiabetes and antiobesity effect of cryptotanshinone via activation of AMP-activated protein kinase. *Molecular Pharmacology*. 72. 62–72.

- Koistinen, A., Galuska, D., Chibalin, V., Yang, J., Zierath, R., Holman, D., *et al.* (2003). 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52. 1066–1072.
- Kurth-Kraczek, E., Hirshman, M., Goodyear, L., Winder, W. (1999). 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*. 48. 1667–1671.
- Lee, J., Koo, N., Min, D. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3. 21–33.
- Lin, Y., Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*. 204. 1-11.
- Maiese, K. (2015). New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015. 1-17
- Maldonado, D., Alvarez-Idaboy, R., Aguilar-González, A., Lira-Rocha, A., Jung-Cook, H., Medina-Campos, N., *et al.* (2011). Role of allyl group in the hydroxyl and peroxy radical scavenging activity of S-allylcysteine. *The Journal of Physical Chemistry*. 115. 13408–13417.
- Modak, M., Dixit, P., Londhe, J., Ghaskadbi, S., Paul A. Devasagayam, T. (2007). Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 40. 163–173.
- Morales-Alamo, D., Calbet, J.A.L. (2016). AMPK signaling in skeletal muscle during exercise: Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 98. 68–77.
- Owen, M.R., Doran, E., Halestrap, A.P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical Journal*. 348. 607–614.
- Pessler-Cohen, D., Pekala, H., Kovsan, J., Bloch-Damti, A., Rudich, A., Bashan, N. (2006). GLUT4 repression in response to oxidative stress is associated with reciprocal alterations in C/EBP alpha and delta isoforms in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 112. 3–12.
- Pessler, D., Rudich, A., Bashan, N. (2001). Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. *Diabetologia*. 44. 2156–2164.
- Pitocco, D., Tesauro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G., Cardillo, C. (2013). Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications. *International Journal of Molecular Sciences*. 14. 21525–21550.
- Rea, S., James, D.E. (1997). Moving GLUT4: The Biogenesis and Trafficking of GLUT4

Storage Vesicles. *Diabetes*. 46. 1667–1677.

Shao, D., Oka, S., Liu, T., Zhai, P., Ago, T., Sciarretta, S., Li, *et al.* (2014). A Redox-Dependent Mechanism for Regulation of AMPK Activation by Thioredoxin1 during Energy Starvation. *Cell Metabolism*. 19. 232–245.

Styskal, J., Van Remmen, H., Richardson, A., Salmon, A.B. (2012). Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?. *Free Radical Biology and Medicine*. 52. 46–58.

Thomson, M., Al-Qattan, K.K., Bordia, T., Ali, M. (2006). Including Garlic in the Diet May Help Lower Blood Glucose, Cholesterol, and Triglycerides. *Journal of Nutrition*. 136. 800S–802S.

Thomson, M., Al-Qattan, K.K., JS, D., Ali, M., (2016). Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39. 44–84.

Watson, R.T., Pessin, J.E., (2001). Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Progress in Hormone Research*. 56. 175–193.

Yang, J., Zhao, P., Wan, D., Zhou, Q., Wang, C., Shu, G., *et al.* (2014). Antidiabetic Effect of Methanolic Extract from *Berberis julianae* Schneid. via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Type 2 Diabetic Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014. 1-12.

Zhang, B.B., Zhou, G., Li, C. (2009). AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*. 9. 407–416.