



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de
la República
(PROPAC)

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE HOJAS DE MORINGA
(*Moringa oleifera*) EN LA MUTANTE *InR* DE *Drosophila*
melanogaster, MODELO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta: L.N. Norma Angélica López Rodríguez.

Dirigido por: Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.
Co-dirigido por: Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar (UNAM).

CU, Santiago de Querétaro, Qro, octubre de 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**“EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE HOJAS DE MORINGA (*Moringa oleifera*) EN LA MUTANTE *InR* DE *Drosophila melanogaster*,
MODELO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L.N. Norma Angélica López Rodríguez.

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.

Co-Dirigido por:

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar.

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Co-Director

Dra. Rocio Campos Vega
Vocal

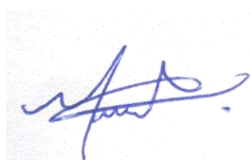
Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Suplente

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre de 2020
México

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y reporto detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Norma Angélica López Rodríguez

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña, por su apoyo, guía y acompañamiento durante estos años de estudio.

Al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar, al Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado y a la M. en C. Jessica Paloma Álvarez Rendón, por su experiencia y su guía para la realización de este proyecto.

A la Dra. Rocio Campos Vega, Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz y Dra. Rosalía Reynoso Camacho, por sus consejos y valiosas aportaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento para concretar este posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por la oportunidad de crecer profesionalmente en esta casa de estudios.

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, por el acceso a sus instalaciones para la realización de gran parte de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio y a la Dra. Liceth Cuéllar Núñez, por su apoyo, sus consejos y la gran amistad que formamos.

A mi familia, especialmente a mi madre, por siempre apoyarme y motivarme a alcanzar mis metas.

A Daniel, por su compañía, su apoyo incondicional y por compartir y concretar juntos esta etapa profesional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Enfermedades crónicas no transmisibles.....	3
2.1.1. Impacto en salud pública por enfermedades crónico-degenerativas.....	3
2.2. Diabetes Mellitus.....	4
2.2.1. Generalidades y clasificación.....	4
2.2.2. Insulina: mecanismo de acción y resistencia a la insulina.....	5
2.2.3. Diabetes mellitus tipo 2: Fisiopatología.....	6
2.2.4. Complicaciones en salud por Diabetes Mellitus tipo 2.....	8
2.2.5. Prevalencia de diabetes mellitus en México.....	8
2.2.6. Tratamiento.....	9
2.2.6.1. Farmacológico.....	9
2.2.6.2. Estilo de vida.....	10
2.2.6.3. Alternativas naturales.....	10
2.3. <i>Moringa Oleifera</i>	11
2.3.1. Generalidades.....	11
2.3.2. Composición química.....	12
2.3.2.1. Hojas.....	13
2.3.2.2. Propiedades biológicas de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	15
2.3.2.3. Efecto hipoglucemiante de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	16
2.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.4.1. Generalidades.....	18
2.4.2. Vía de la insulina en <i>Drosophila melanogaster</i>	20
2.4.3. Modelo <i>InR</i>	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo general.....	25

4.2. Objetivos específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Materiales.....	26
5.1.1. Material biológico.....	26
5.1.2. Reactivos.....	26
5.2. Métodos.....	27
5.2.1. Caracterización química de hojas de <i>Moringa oleifera</i>	27
5.2.1.1. Cuantificación de proteína (Técnica 920.87).	27
5.2.1.2. Cuantificación de lípidos (Técnica 920.39).	28
5.2.1.3. Cuantificación de humedad (Técnica 925.10).	28
5.2.1.4. Cuantificación de cenizas (Técnica 923.03).	28
5.2.1.5. Cuantificación de carbohidratos.....	29
5.2.2. Determinación de compuestos bioactivos.	29
5.2.2.1. Fibra dietaria.....	29
5.2.2.1.1. Fibra insoluble.	29
5.2.2.1.2. Fibra soluble.	30
5.2.3. Determinación de compuestos fenólicos.	31
5.2.3.1. Obtención de extracto metanólico.	31
5.2.3.2. Cuantificación de fenoles totales.	31
5.2.3.3. Cuantificación de flavonoides.	31
5.2.3.4. Cuantificación de taninos condensados.	32
5.2.3.5. Determinación de glucosinolatos (HPLC).	32
5.2.3.6. Determinación de glucosinolatos (espectrofotometría).	33
5.2.4. Determinación de capacidad antioxidante.	34
5.2.4.1. Capacidad antioxidante por método DPPH.	34
5.2.4.2. Capacidad antioxidante por método ABTS.....	35
5.2.5. Ensayo de <i>Drosophila melanogaster</i> (mutantes <i>InR</i> y controles <i>yw</i>).....	35
5.2.5.1. Preparación de alimento.....	38
5.2.6. Medición de parámetros metabólicos.	39
5.2.6.1. Determinación de carbohidratos totales.	39
5.2.6.2. Determinación de glucosa.	39

5.2.6.3. Determinación de glucógeno.	40
5.2.7. Determinación de parámetros asociados a alteraciones del receptor de insulina.	40
5.2.7.1. Determinación de sobrevivencia (pupas y adultos).	40
5.2.7.2. Determinación de peso.	41
5.2.7.3. Extracción y determinación de lípidos totales.	41
5.2.7.4. Extracción y determinación de triglicéridos.	42
5.3. Análisis estadístico.	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1. Caracterización química y compuestos bioactivos de hojas de moringa (<i>Moringa oleifera</i>).	43
6.2. Capacidad antioxidante (ABTS y DPPH).	48
6.3. Ensayo biológico de Diabetes mellitus: <i>Drosophila melanogaster</i>	50
6.3.1. Efectos del consumo de hojas de moringa sobre la sobrevivencia.	50
6.3.2. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el cambio de peso.	55
6.3.3. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el contenido de carbohidratos totales.	60
6.3.4. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre los niveles de glucosa total.	64
6.3.5. Efectos del consumo de hojas de moringa sobre los niveles de glucógeno total.	69
6.3.6. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el contenido de lípidos totales.	71
6.3.7. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre los niveles de triglicéridos.	76
6.4. Integración de resultados por sexo (machos <i>yw</i> e <i>InR</i> ; hembras <i>yw</i> e <i>InR</i>).	80
7. CONCLUSIONES.	84
8. BIBLIOGRAFÍA.	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales causas de defunciones en México (2017).....	3
Cuadro 2. Valores normales de glucosa en sangre.	7
Cuadro 3. Porcentaje de adultos con diagnóstico de diabetes en México.	9
Cuadro 4. Composición nutricional de <i>Moringa oleifera</i> (hojas, semillas y vainas) por cada 100 g de producto.	12
Cuadro 5. Compuestos bioactivos identificados en diferentes muestras de hojas de moringa.	13
Cuadro 6. Contenido de la composición química y compuestos bioactivos de la muestra de hojas de moringa.	43
Cuadro 7. Capacidad antioxidante de polvo de hojas de moringa.	48
Cuadro 8. Total de pupas de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	51
Cuadro 9. Total de adultos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	52
Cuadro 10. Comparación de sobrevivencia entre cepa <i>yellow-white</i> criada con dieta estándar y la cepa <i>InR</i> criada con dieta suplementada con polvo de hojas de moringa.	55
Cuadro 11. Peso total de machos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	56
Cuadro 12. Peso total de hembras de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	57
Cuadro 13. Contenido de carbohidratos totales de machos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	61
Cuadro 14. Contenido de carbohidratos totales de hembras de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	62

Cuadro 15. Comparación de carbohidratos totales entre cepa mutante <i>InR</i> suplementada con polvo de hojas de moringa y cepa silvestre <i>yellow-white</i> alimentada con dieta estándar.....	64
Cuadro 16. Niveles de glucosa total de machos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.....	65
Cuadro 17. Niveles de glucosa total de hembras de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.....	66
Cuadro 18. Niveles de glucógeno total de machos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.....	69
Cuadro 19. Niveles de glucógeno total de hembras de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.....	70
Cuadro 20. Concentración de lípidos totales de machos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	73
Cuadro 21. Concentración de lípidos totales de hembras de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.	74
Cuadro 22. Comparación de lípidos totales entre cepa mutante <i>InR</i> suplementada con polvo de hojas de moringa y cepa silvestre <i>yellow-white</i> alimentada con dieta estándar.....	76
Cuadro 23. Niveles de triglicéridos totales de machos de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.....	77
Cuadro 24. Niveles de triglicéridos totales de hembras de cepa silvestre (<i>yw</i>) y cepa mutante (<i>InR</i>) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes dosis de polvo de hojas de moringa.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bioconversión de glucosinolato a isotiocianato por acción de la enzima mirosinasa (Adaptado de Lopez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2020).....	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> (Goenaga, 2010).....	19
Figura 3. Comparación del tamaño corporal de macho (A) y hembra (A1) de cepa <i>yellow-white</i> vs macho (B) y hembra (B1) de cepa <i>InR</i>	22
Figura 4. Huevos de <i>Drosophila melanogaster</i> : (A) huevo heteroalélico, no expresa GFP; (B) huevo heterocigoto, expresando GFP.	36
Figura 5. Dieta estándar y dieta estándar suplementada con diferentes concentraciones de polvo de hojas de moringa (PHM).....	38
Figura 6. Efectos de las diferentes concentraciones de PHM sobre los parámetros evaluados en machos silvestres (<i>yw</i>) y mutantes (<i>InR</i>).	81
Figura 7. Efectos de las diferentes concentraciones de PHM sobre los parámetros evaluados en hembras silvestres (<i>yw</i>) y mutantes (<i>InR</i>).....	82

RESUMEN

La diabetes tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica, hasta hoy incurable, y no transmisible caracterizada por la presencia de insulinoresistencia, por lo que tratamientos hipoglucemiantes son deseables para mejorar la salud de pacientes con DM2. Se ha informado del efecto hipoglucemiante de extractos de hojas de *Moringa oleifera*, sin embargo, no se ha determinado este efecto después de la ingesta crónica del polvo de hojas de moringa (PHM), ni su regulación sobre parámetros relacionados con la vía de la insulina. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos del consumo crónico de PHM utilizando el modelo de moscas de *Drosophila melanogaster* mutadas en alelos del receptor de insulina (*InR*) y moscas control *yellow-white* (*yw*). Se determinó la composición química y algunos compuestos bioactivos del PHM, reportando 49.96 ± 0.80 % de carbohidratos, 29.34 ± 0.25 % de proteínas, 30.15 ± 0.30 % de fibra total, 46.23 ± 0.53 mg equivalentes de ácido gálico/g de compuestos fenólicos libres y 29.49 ± 1.48 mg equivalentes de sinigrina/g de glucosinolatos totales. Tras la suplementación con 0.5, 1.5, 2.5, 4.0 y 5.5 % de PHM, se evaluaron los niveles de carbohidratos totales, glucosa, glucógeno, lípidos totales y triglicéridos en moscas vírgenes de 4-5 días post-eclosión. Adicionalmente, se determinó la sobrevivencia y el cambio de peso. Como resultados, la sobrevivencia de moscas criadas con 1.5-2.5 % de PHM incrementó >15 %. Machos *yw* tratados con 0.5-2.5 % de PHM presentaron regulación de peso corporal y disminución de carbohidratos totales y glucosa (reducción de 23-28%). En machos *InR* no se informó un efecto hipoglucemiante. Hembras *yw* presentaron reducción de peso, carbohidratos totales y glucosa con 1.5-2.5 % de PHM. Los niveles de glucógeno disminuyeron en moscas *InR* con 5.5 % de PHM. Los lípidos totales redujeron en ambas cepas (~15-30 %) con la suplementación de 0.5-2.5 % de PHM. Los resultados indican cambios metabólicos dependientes del sexo tras la ingesta crónica de PHM; bajas concentraciones de PHM mejoran la sobrevivencia, reducen carbohidratos y regulan los niveles de lípidos, especialmente en moscas *yw*, sugiriendo que el PHM podría mejorar la salud de personas con DM2.

(Palabras clave: Diabetes mellitus, receptor de insulina, *Moringa oleifera*, *Drosophila melanogaster*).

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic, up to today incurable, non-communicable disease characterized by insulin resistance. Simple hypoglycemic treatments are desirable, as they may improve T2D patients' health. Consumption of *Moringa oleifera* leaf extracts has been reported as hypoglycemic. However, the hypoglycemic effect of moringa leaf powder (MLP) chronic intake has not been assessed, nor its regulation over insulin pathway parameters. The objective of this research was to evaluate the effects of MLP chronic consumption employing the *Drosophila melanogaster* sole insulin receptor (*InR*) mutant alleles and *yellow-white* (*yw*) control flies. For this purpose, the MLP chemical composition and some bioactive compounds were determined. MLP had 49.96 ± 0.80 % carbohydrates and 29.34 ± 0.25 % protein; 30.15 ± 0.30 % total fiber 46.23 ± 0.53 mg gallic acid equivalents/g free phenolic compounds, and 29.49 ± 1.48 mg sinigrin equivalents/g total glucosinolates. After diet supplementation with 0.5, 1.5, 2.5, 4.0 and 5.5 % of MLP, the levels of carbohydrates, glucose, glycogen, total lipids, and triglycerides were measured in virgin flies of 4-5 days of emergence. Additionally, survivorship and weight changes were determined. The results of the *InR* mutant flies (with a T2D phenotype) were compared to control *yw* flies. As a result, survivorship increased in both strains up to 15 % after 1.5-2.5 % MLP intake. *yw* males showed weight control, as well as total carbohydrate and glucose reduction (23-28 %) after 0.5-2.5 % MLP intake; while no decrease was found in *InR* males for these parameters. Weight loss, total carbohydrate, and total glucose reduction were reported for *yw* females after 1.5-2.5 % MLP intake. In addition, glycogen levels decreased in *InR* flies with 5.5 % MLP supplementation. Both strains reported a lipid lowering effect (~15-30 %) with 0.5-2.5 % MLP intake. Results indicate metabolic changes in a sex-dependent manner due to MLP chronic intake. Furthermore, MLP low concentrations improve flies' survivorship, reduce total carbohydrates and glucose, and regulate lipid levels, especially in the *yw* strain, suggesting that MLP consumption may improve T2D patients' health.

(Keywords: Type 2 diabetes, insulin receptor, *Moringa oleifera*, *Drosophila melanogaster*).

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles constituyen un grave problema de salud pública, cuyo tratamiento genera altos costos y repercute en la calidad de vida de pacientes y de sus familias. Este grupo de patologías suelen aparecer debido a una alimentación incorrecta y a un estilo de vida poco saludable, como el sedentarismo y el consumo de sustancias nocivas para la salud.

La diabetes mellitus tipo 2, considerada como una enfermedad hasta el momento incurable, actualmente es la segunda causa de defunciones en México. Es un tipo de diabetes caracterizada por la pérdida progresiva de la producción de insulina en el páncreas, dando como resultado niveles altos de glucosa sanguínea, es decir, hiperglucemia. Una condición de hiperglucemia crónica genera un incremento de radicales libres en el organismo, y, por consiguiente, un estado de estrés oxidativo. Dicho estrés oxidativo repercute sobre las células β del páncreas, induciendo su apoptosis (muerte celular programada) y disminuyendo su capacidad para producir insulina.

Además del consumo de fármacos, se ha recomendado el uso de terapias alternativas naturales para el tratamiento de la diabetes, entre ellas la fitoterapia. La fitoterapia considera el consumo de plantas con efecto hipoglucemiante, ya sea en forma de extractos, infusiones, tabletas o algún otro tipo de preparación.

La planta *Moringa oleifera* ha sido estudiada para el tratamiento de la diabetes tipo 2 debido a su poder antioxidante, antiinflamatorio e hipoglucemiante, el cual se atribuye, principalmente, a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, glucosinolatos e isotiocianatos. Extractos de hojas de moringa ricos en isotiocianatos y extractos enriquecidos en compuestos fenólicos han mostrado un efecto hipoglucemiante en cepas de ratones insulinoresistentes. El efecto hipoglucemiante de un aislado proteico de hojas de moringa ha sido demostrado también en ratones con diabetes tipo 1 inducida. Se ha reportado,

además, que algunos de estos extractos de hojas de moringa mejoran la cascada de señalización de la insulina. Sin embargo, el consumo de hojas enteras, cuya composición integra otros compuestos bioactivos, podría potenciar el efecto hipoglucemiante o bien, contrarrestarlo.

Drosophila melanogaster, comúnmente conocida como mosca de la fruta, es considerada un organismo genético modelo para realizar investigaciones relacionadas con el metabolismo, debido a la homología entre su genoma y el genoma humano. La señalización de la insulina en *D. melanogaster* se propaga a través de péptidos similares a la insulina de vertebrados, producidos por células productoras de insulina. Una vez que dichos péptidos son liberados, éstos se unen a su receptor, el receptor de la insulina, el cual se activa y desencadena una cascada de fosforilaciones para que los péptidos ejerzan su efecto hipoglucemiante. Existen cepas de *D. melanogaster* que son mutantes en el gen homólogo al receptor de la insulina (*InR*). Este tipo de moscas suelen ser obesas y de menor tamaño, presentan también mayor contenido de lípidos y carbohidratos respecto a su peso, además de alteraciones en el sistema nervioso. Debido a sus características, dicho modelo mutante es considerado una alternativa viable para el desarrollo de investigaciones sobre diabetes mellitus tipo 2.

Con base en lo anterior, se propuso evaluar el efecto del consumo crónico de las hojas de moringa en el modelo mutante *InR* de *Drosophila melanogaster*, con la finalidad de esclarecer el potencial hipoglucemiante del polvo de hojas de moringa en la mejora del fenotipo característico de la diabetes mellitus tipo 2.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades crónicas no transmisibles.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como enfermedades de larga duración y progresión lenta, para las cuales aún no existe un tratamiento correctivo eficiente, por lo que el mejoramiento del paciente se logra a través del consumo de fármacos, la práctica de ejercicio, el consumo de una dieta sana y terapias alternativas (OMS, 2018a). En este grupo de enfermedades se enlistan aquellas relacionadas con el estrés oxidativo, como lo es la diabetes mellitus tipo 2 (Beratarrechea, 2010; López-Ramos, 2010; López-López *et al.*, 2016).

2.1.1. Impacto en salud pública por enfermedades crónico-degenerativas.

Según datos de la OMS (2018a), a nivel mundial, las ECNT son las responsables de casi cuatro de cada cinco muertes cada año. En el Cuadro 1 se muestran las principales causas de defunciones en México para el 2017.

Cuadro 1. Principales causas de defunciones en México (2017).

Importancia	Causa	Defunciones
1	Enfermedades del corazón	141,619
2	Diabetes Mellitus	106,525
3	Tumores malignos	84,142
4	Enfermedades del hígado	38,833
5	Accidentes	36,215
6	Enfermedades cerebrovasculares	35,248
7	Agresiones	32,079
8	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	22,954
9	Influenza y neumonía	21,892
10	Insuficiencia renal.	13,167

(INEGI, 2018)

En México, este grupo de patologías ocasionan aproximadamente el 80 % del total de fallecimientos en el país, generando un impacto a nivel económico y social (INEGI, 2018).

2.2. Diabetes Mellitus.

2.2.1. Generalidades y clasificación.

La diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, dando como resultado un incremento persistente de los niveles de glucosa en sangre; su etiología multifactorial radica en aspectos tanto ambientales (estilo de vida y alimentación principalmente) como predisposición hereditaria (Kharroubi & Darwish, 2015; Menéndez-García *et al.*, 2015).

La Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en Inglés) define a la diabetes mellitus como una condición caracterizada por un estado de hiperglucemia, debido a la incapacidad del organismo para aprovechar la glucosa proveniente de los alimentos (ADA, 2019).

Dependiendo de su etiología, la diabetes mellitus se clasifica en: diabetes mellitus tipo 1 (resultado de la destrucción autoinmune de las células β), diabetes gestacional (diagnosticada exclusivamente durante el embarazo), diabetes mellitus tipo 2 y otros tipos específicos de diabetes debido a diferentes causas (Rojas *et al.*, 2018; ADA, 2019).

En el caso de la diabetes mellitus tipo 2, esta patología es el resultado de la pérdida progresiva de la producción de insulina por parte de las células β pancreáticas y, generalmente, debido a un estado de resistencia a la insulina. Los pacientes con este tipo de diabetes suelen presentar obesidad, sin embargo, no es un factor determinante para el desarrollo de la patología (ADA, 2019).

2.2.2. Insulina: mecanismo de acción y resistencia a la insulina.

La insulina es una hormona compuesta por dos cadenas, A y B, que lleva a cabo su acción al unirse al receptor de insulina (Viková *et al.*, 2016). Considerada dentro del grupo de factores de crecimiento insulinoides (Assefa *et al.*, 2017), es una hormona producida por las células β , localizadas en los islotes de Langerhans del páncreas, en respuesta al aumento de los niveles de glucosa plasmática. La insulina ejerce un efecto sobre la homeostasis de la glucosa al promover la captación y metabolismo de ésta última en los diferentes órganos y tejidos, principalmente en músculo esquelético, tejido adiposo y en el hígado (Salinas-Contreras & Hiriart, 2016).

El receptor de la insulina está conformado por dos subunidades α y dos subunidades β ; es un receptor que se encuentra presente en todas las células de los mamíferos con actividad tirosina-cinasa intrínseca (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013). Las dos subunidades α del receptor de la insulina se encuentran en la región extracelular, mientras que las subunidades β son transmembranales. Una vez unida la insulina a su receptor en las subunidades α , las subunidades β sufren un cambio conformacional, provocando la autofosforilación cruzada en los residuos de tirosina del receptor (Salinas-Contreras & Hiriart, 2016). Esta modificación promueve la fosforilación y la activación del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) en el citosol, que posteriormente activa a fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y a la proteína cinasa B (PKB/AKT1). PI3K y PKB/AKT1, a su vez, favorecen una serie de fosforilaciones que contribuyen a la translocación del transportador de glucosa (GLUT4) desde vesículas en el citosol hacia la membrana plasmática (Aguirre *et al.*, 2016; Assefa *et al.*, 2017). Una vez en la membrana plasmática, GLUT 4 permite el paso de glucosa hacia el interior de la célula para su posterior oxidación, producción de energía y almacenamiento (Ceddia *et al.*, 2004).

Cuando la acción biológica de la insulina no se ve reflejada en los tejidos sobre los cuales actúa, a concentraciones que suelen ser efectivas en sujetos sanos, se presenta un fenómeno conocido como resistencia a la insulina (Calderín-Bouza *et al.*, 2014).

La insulinoresistencia conlleva a una disminución del paso de glucosa hacia el interior de la célula, provocando que la glucosa permanezca elevada en la sangre, promoviendo así una mayor secreción de insulina (Cantley y Ashcroft, 2015). De esta forma, llega un momento en que las células β del páncreas se agotan, dejan de producir suficiente insulina y se manifiesta un estado de hiperglucemia crónica junto con insulinoresistencia (Salinas-Contreras & Hiriart, 2016).

2.2.3. Diabetes mellitus tipo 2: Fisiopatología.

La diabetes mellitus tipo 2 suele ser asintomática en sus inicios; no obstante, algunas manifestaciones clínicas que pueden llegar a presentarse debido a la hiperglucemia crónica son: poliuria (orina en exceso), polidipsia (sed en exceso), polifagia (hambre excesiva), pérdida de peso y deshidratación (Mealey & Ocampo, 2007).

Se han establecido parámetros de control de glucosa en sangre tanto en ayuno, como glucemia posprandial (glucosa plasmática dos horas después de comer) (ADA, 2019). Los niveles normales de glucosa sanguínea, para individuos con y sin diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores normales de glucosa en sangre.

Paciente sin diabetes		
Glucosa en ayuno	Nivel saludable	70-100mg/dL
	Moderadamente alta (prediabetes)	100-125mg/dL
	Hiperglucemia	>125mg/dL
Glucosa posprandial	Saludable a moderadamente alta	<140mg/dL
	Hiperglucemia	>180mg/dL
Paciente con diabetes		
Glucosa en ayuno	Nivel saludable	70-130mg/dL
	Hiperglucemia	>130mg/dL
Glucosa posprandial	Nivel saludable	<180mg/dL
	Hiperglucemia	>180mg/dL

(ADA, 2019)

La obesidad se asocia fuertemente al desarrollo de diabetes tipo 2 debido a que el aumento de tejido graso exige un incremento de concentraciones plasmáticas de insulina para que los adipocitos puedan captar y metabolizar la glucosa (Salinas-Contreras & Hiriart, 2016). Por este motivo, es común que en la diabetes tipo 2 se presenten dos anomalías fisiopatológicas: 1) resistencia a la insulina y 2) defectos en la función de las células β del páncreas y, por consiguiente, deficiencia de insulina (Halban *et al.*, 2014; ADA, 2019). Las células β pancreáticas son sensibles a los niveles altos de glucosa en sangre y pueden llegar a morir por glucotoxicidad, debido a un estado de estrés sobre el retículo endoplásmico y a la subsecuente activación de genes pro-apoptóticos (Miani *et al.*, 2013).

Además de su efecto hipoglucemiante, la insulina regula la síntesis de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de manera que un estado de insulinoresistencia se ha visto asociado con el incremento de las VLDL producidas en el hígado, dando como resultado un estado de hipertrigliceridemia. El incremento

de ácidos grasos libres en el plasma ocasiona lipotoxicidad sobre las células pancreáticas, anomalía que, junto con la glucotoxicidad, genera un fenómeno conocido como glucolipototoxicidad (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013; Rojas *et al.*, 2018).

El problema en pacientes con obesidad radica, además, en que el tejido adiposo libera proteínas diabetogénicas como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-6 (interleucina seis) y leptina. Tanto TNF- α como IL-6 conducen a la muerte celular por medio de reacciones inflamatorias y la generación de estrés oxidativo (Halban *et al.*, 2014; Abderrazak *et al.*, 2016). De esta forma, con el paso del tiempo, la secreción de insulina disminuye debido a la muerte de las células β pancreáticas, dando como resultado el desarrollo de insulinodependencia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Zaccardi *et al.*, 2016; Kharroubi & Darwish, 2015).

2.2.4. Complicaciones en salud por Diabetes Mellitus tipo 2.

Según la NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, entre las principales complicaciones que se presentan, como consecuencia de una diabetes descontrolada, se pueden mencionar: angiopatía, nefropatía, neuropatía y retinopatía diabéticas. La Federación Mexicana de Diabetes (FMD) menciona que la diabetes es la primera causa de amputaciones en México; mientras que Rojas-Martínez *et al.* (2018) reportaron que la proporción de adultos con diabetes que presentó úlceras y amputaciones aumentó en el año 2016 con respecto al año 2012.

2.2.5. Prevalencia de diabetes mellitus en México.

Datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), en el año 2018, reportaron que el 11.4 % de las mujeres y el 9.1 % de los hombres, mayores de 20 años, había recibido diagnóstico de diabetes tipo 2, reportando un total de 8.6

millones de personas mayores de 20 años con esta patología. En el Cuadro 3 se presenta la prevalencia de adultos diagnosticados con diabetes en México.

Cuadro 3. Porcentaje de adultos con diagnóstico de diabetes en México.

Edad (años)	Hombres		Mujeres		Total	
	No. (miles)	%	No. (miles)	%	No. (miles)	%
20-29	23.0	0.3	153.1	1.6	176.3	1.0
30-39	70.0	0.9	275.6	3.1	345.6	2.1
40-49	543.6	9.4	582.6	8.2	1126.2	8.7
50-59	743.9	17.7	872.1	17.2	1616.0	17.4
60-69	951.8	27.7	1228.4	32.7	2180.2	30.3
70-79	280.1	19.3	500.5	29.8	780.5	24.9
80 o más	80.6	12.5	159.3	21.8	239.9	17.5
Total	2693.2	8.4	3771.6	10.3	6464.8	9.4

(Hernández *et al.*, 2016)

Actualmente la diabetes mellitus tipo 2 constituye la segunda causa de muerte a nivel nacional (OMS, 2018b).

2.2.6. Tratamiento.

2.2.6.1. Farmacológico.

Cualquier tratamiento efectivo para controlar la diabetes mellitus tipo 2 tiene como objetivo reducir los niveles de glucosa sérica y de hemoglobina glucosilada (HbA1c). La HbA1c es un valor que refleja, en forma de porcentaje, el promedio de los niveles de glucosa en sangre de los tres meses previos a la toma de muestra (ADA, 2019). En cuanto al uso de fármacos, la disminución de los niveles de glucosa y de HbA1c se logra, generalmente, mediante el consumo de hipoglucemiantes orales, como metformina (fármaco insulino-sensibilizador), sulfonilureas (fármaco

insulino-secretor) o ambas, en las dosis establecidas por el sector salud (IMSS, 2014).

2.2.6.2. Estilo de vida.

Aunado al uso de fármacos, se ha demostrado que la práctica de actividad física, al menos treinta minutos al día, mejora la sensibilidad a la insulina y ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre (Yates *et al.*, 2015). En cuanto a hábitos de alimentación, se recomienda una intervención alimentaria que, además de reducir los niveles de glucosa plasmática, prevenga la aparición de factores de riesgo cardiovascular. La restricción y adecuación de nutrientes en la dieta pueden disminuir la probabilidad de padecer dislipidemias o hipertensión (Forero *et al.*, 2018).

2.2.6.3. Alternativas naturales.

Las terapias alternativas se basan en el manejo de productos naturales, algunos de ellos sustentados por el método científico (Cano-Rodríguez & Ballesteros-Pomar, 2018). La fitoterapia ha sido considerada en el tratamiento de la diabetes tipo 2 como una alternativa para retrasar o evitar el consumo de fármacos debido a que su práctica implica el uso de plantas con propiedades medicinales, entre ellas, propiedades hipoglucemiantes (Ríos *et al.*, 2016). De dichas plantas lo que se pretende es aprovechar sus principios bioactivos mediante su consumo en forma de extractos, infusiones, tabletas o algún otro tipo de preparación (Gallegos-Zurita, 2016).

El amplio uso de plantas en el manejo de la diabetes se debe, principalmente, a la presencia de polifenoles y sustancias cuyo mecanismo de acción mejora la homeostasis de la glucosa (Cano-Rodríguez & Ballesteros-Pomar, 2018). Existen plantas cuyos compuestos bioactivos tienen la capacidad de inhibir actividades enzimáticas (α -glucosidasas o α -amilasas); actuar sobre la captación y transporte

de glucosa por medio de los transportadores GLUT4; incrementar niveles de insulina en sangre; y disminuir la generación de radicales libres (Ríos *et al.*, 2016).

Una alternativa natural estudiada en los últimos años ha sido el árbol *Moringa oleifera*. El árbol de moringa posee un contenido importante de polifenoles y glucosinolatos que le confieren un poder antioxidante de gran interés para el manejo terapéutico de patologías como la diabetes mellitus tipo 2 (Rajanandh *et al.*, 2012; Jaja-Chimedza *et al.*, 2018).

2.3. *Moringa Oleifera*

2.3.1. Generalidades.

Moringa oleifera, comúnmente conocida como moringa, es un árbol perteneciente a la familia Moringaceae, originario de los Himalayas, en la zona noroeste de la India. Puede encontrarse también en regiones de África, Arabia, Sureste de Asia, Islas del Pacífico y del Caribe, así como al sur del continente Americano (Abdull-Razis *et al.*, 2014; Valdez-Solana *et al.*, 2015). En México, puede producirse en la costa del Pacífico, desde las entidades de Baja California y Sonora, hasta el estado de Chiapas (Olson & Fahey, 2011; Leone *et al.*, 2015; Castillo-López *et al.*, 2017).

El árbol de moringa presenta múltiples propiedades, tanto nutricionales como nutraceuticas; todos los componentes del árbol son utilizados para diferentes aplicaciones por la industria (Paliwal *et al.*, 2011). Las hojas de moringa pueden ser consumidas ya frescas, cocidas o en forma de polvo seco para combatir problemas de malnutrición; además, han sido motivo de investigación por su efecto terapéutico y nutritivo (Mbikay, 2012). Por lo anterior, *Moringa oleifera* es considerada una planta con propiedades funcionales que se ven reflejadas en sus efectos antiinflamatorios, antihipertensivos, antidiabéticos, antioxidantes, anticancerígenos e hipolipemiantes (Abdull-Razis *et al.*, 2014).

2.3.2. Composición química.

Diferentes partes del árbol de moringa contienen una cantidad importante de macro y micronutrientes. En el Cuadro 4 se presenta la composición química y nutricional de las hojas, semillas y vainas de moringa.

Cuadro 4. Composición nutricional de *Moringa oleifera* (hojas, semillas y vainas) por cada 100 g de producto.

Nutriente / compuesto	Hojas			Semillas	Vainas (frutos)
	Frescas	Secas	Polvo		
Energía (kcal)	92	329	205	--	26
Proteínas (g)	6.7	29.4	27.1	35.97 ± 0.19	2.5
Grasas (g)	1.7	5.2	2.3	38.67 ± 0.03	0.1
Carbohidratos (g)	12.5	41.2	38.2	8.67 ± 0.12	3.7
Fibra (g)	0.9	12.5	19.2	2.87 ± 0.03	4.8
Vitamina B1 (mg)	0.06	2.02	2.64	0.05	0.05
Vitamina B2 (mg)	0.05	21.3	20.5	0.06	0.07
Vitamina B3 (mg)	0.8	7.06	8.2	0.2	0.2
Vitamina C (mg)	220	15.8	17.3	4.5 ± 0.17	120
Vitamina E (mg)	448	10.8	113	751.67 ± 4.41	--
Calcio (mg)	440	2185	2003	45	30
Magnesio (mg)	42	448	368	635 ± 8.66	24
Fósforo (mg)	70	252	204	75	110
Potasio (mg)	259	1236	1324	--	259
Cobre (mg)	0.07	0.49	0.57	5.20 ± 0.15	3.1
Hierro (mg)	0.85	25.6	28.2	--	5.3
Azufre (mg)	--	--	870	0.05	137

(Gopalakrishnan *et al.*, 2016)

Además, se ha identificado la presencia de glucosinolatos, ácidos fenólicos, carotenoides y tocoferoles (Maizuwo *et al.*, 2017). Los glucosinolatos se encuentran presentes en toda la planta de moringa, sin embargo, se ha identificado un mayor contenido de estos compuestos tanto en las hojas como en las semillas (Bennett *et al.*, 2003; Amaglo *et al.*, 2010).

2.3.2.1. Hojas

Se ha reportado que las hojas de moringa contienen proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, así como carotenoides, polifenoles, glucosinolatos, taninos, saponinas, oxalatos y fitatos (Leone *et al.*, 2015; Maizuwo *et al.*, 2017). En el Cuadro 5 se muestran algunos compuestos bioactivos que han sido identificados en las hojas de moringa.

Cuadro 5. Compuestos bioactivos identificados en diferentes muestras de hojas de moringa.

Compuesto	Concentración (peso seco)	Referencia
Ácido gálico	53.98 ± 2.92 µg/g	Cuellar-Nuñez <i>et al.</i> (2018)
Ácido clorogénico	471.22 ± 2.32 µg/g	
Ácido cafeico	5.10 ± 0.19 µg/g	
Ácido p-cumárico	82.11 ± 0.22 µg/g	
Catequina	5.98 ± 0.01 mg/g	Ademiluyi <i>et al.</i> (2018)
Epicatequina	18.63 ± 0.01 mg/g	
Rutina	70.21 ± 0.03 mg/g	
Quercetina	19.87 ± 0.03 mg/g	
Kaempferol	19.65 ± 0.02 mg/g	
Glucosinolatos totales	21.22 ± 3.7 mg eq. sinigrina/g	Leone <i>et al.</i> (2018)

Diversos estudios han reportado que las hojas deshidratadas de moringa contienen cantidades importantes de vitaminas A, C y E, así como de polifenoles, principalmente ácidos fenólicos, los cuales se encuentran en altas concentraciones en comparación con ciertas frutas y vegetales (El-Sohaimy *et al.*, 2015; Falowo *et al.*, 2016; Leone *et al.*, 2018). La presencia de compuestos fenólicos confiere potencial nutracéutico a las hojas de moringa al ser capaces de retardar el desarrollo de ECNT, debido a su fuerte acción antioxidante (Singh *et al.*, 2009).

Asimismo, en hojas deshidratadas de moringa, Moyo *et al.* (2011) reportaron la presencia de los aminoácidos esenciales treonina, tirosina, metionina, fenilalanina, isoleucina, leucina, histidina, lisina y triptófano; otros compuestos identificados fueron los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6, siendo el ácido α -linolénico el de mayor concentración. Cabe mencionar que algunos factores antinutricionales presentes en las hojas (taninos, saponinas, oxalatos y fitatos) se encuentran en cantidades que no generan efectos nocivos en la salud (Leone *et al.*, 2015).

Respecto a los glucosinolatos, estos son metabolitos secundarios de las plantas cuya estructura está formada por una unidad de β -D-glucopiranosil y un (*Z*)-tiohidroximato anomérico O-sulfatado, conectados a una cadena lateral que puede variar dependiendo del metabolismo de los aminoácidos propios de la planta (Maldini *et al.*, 2014).

Los glucosinolatos se convierten en isotiocianatos por acción de la enzima endógena mirosinasa, ubicada en las vacuolas de las células de mirosinasa, la cual cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos cuando la planta es sometida a daño o estrés (Figura 1) (Waterman *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015). En las hojas de moringa, el glucosinolato más abundante es el 4-[(α -L-ramnopiranosiloxi)-bencil]-glucosinolato, conocido como glucomoringina, acompañado de tres glucosinolatos isoméricos en menor cantidad (Waterman *et al.*, 2014; Förster *et al.*, 2015).

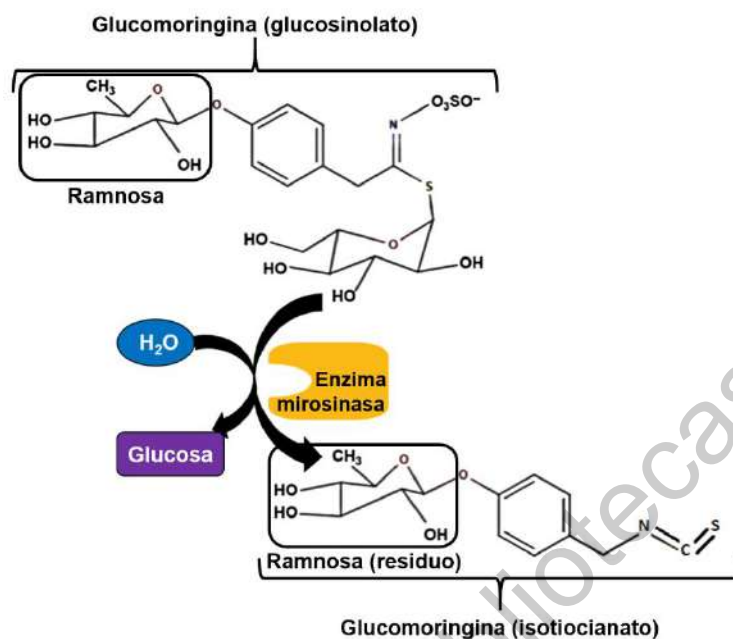


Figura 1. Bioconversión de glucosinolato a isotiocianato por acción de la enzima mirosinasa (Adaptado de Lopez-Rodriguez *et al.*, 2020).

2.3.2.2. Propiedades biológicas de hojas de *Moringa oleifera*.

Como resultado de diversos mecanismos sinérgicos, las hojas de moringa previenen la producción de radicales libres y estrés oxidativo en los tejidos (Tumer *et al.*, 2015; Udechukwu *et al.*, 2018). Diversos autores han reportado la actividad antioxidante de extractos etanólicos y metanólicos de hojas de moringa, informando la mejoría de sistemas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión en modelos *in vivo* (Singh *et al.*, 2014; Omodainisi *et al.*, 2017), así como efectos inhibitorios sobre la expresión de los genes IL-1 β (interleucina 1 beta) e iNOS (óxido nítrico sintasa) en estudios *in vitro* (Waterman *et al.*, 2014; Charoensin, 2014).

Los isotiocianatos presentan acción antiinflamatoria y antioxidante *in vivo* e *in vitro* al ser capaces de activar enzimas de desintoxicación (Maldini *et al.*, 2014). En este sentido, se ha demostrado la reducción de la ganancia de peso y resistencia

a la insulina en ratones con obesidad, debido a la acción de los isotiocianatos presentes en hojas de moringa (Waterman *et al.*, 2015), así como a la reducción en la expresión de algunos marcadores de inflamación como iNOS, IL-1 β e IL-6 y NF-kB (factor nuclear kappa B) (Jaja-Chimedza *et al.*, 2017).

Otros efectos reportados en extractos de hojas de moringa son: efecto anti proliferativo y quimioprotector (Charoensin, 2014; Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018), regulación en los niveles de colesterol y triglicéridos (Waterman *et al.*, 2015), actividad antihipertensiva (Aekthammarat *et al.*, 2019), y, en últimos años, efectos benéficos sobre el sistema nervioso (Jaafaru *et al.*, 2019). Todas estas propiedades se explican, principalmente, por el contenido en compuestos antioxidantes, vitaminas y minerales (Maizuwo *et al.*, 2017; Omodanisi *et al.*, 2017).

2.3.2.3. Efecto hipoglucemiante de hojas de *Moringa oleifera*.

El efecto hipoglucemiante de las hojas de moringa se atribuye a su contenido de fibra y a su poder antioxidante, principalmente (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Se consideran a las hojas de moringa como fuente de fibra dietaria, especialmente fibra insoluble, la cual ejerce un efecto hipoglucemiante al disminuir el tiempo de captación de glucosa en el intestino (Taweerutchana *et al.*, 2017; Leone *et al.*, 2018) por inhibición de la enzima α -amilasa (Azad *et al.*, 2017).

También se ha demostrado que las hojas de moringa presentan efecto hipoglucemiante debido a su contenido de isotiocianatos, los cuales inducen enzimas detoxificantes como glutatión transferasa y NAD(P)H quinona deshidrogenasa (Gupta *et al.*, 2012; Waterman *et al.*, 2015; Omodanisi *et al.*, 2017). Asimismo, la presencia de terpenoides está relacionada con la estimulación de las células β en el páncreas, favoreciendo la secreción de la hormona insulina y, por consiguiente, la reducción de niveles de glucosa plasmática (Tende *et al.*, 2011).

Waterman *et al.* (2015) demostraron el efecto hipoglucemiante de un extracto de hojas de moringa rico en isotiocianatos, suplementando la dieta de ratones obesos de la cepa C57BL/6J. En el estudio se evaluaron niveles de proteínas involucradas en la señalización de la insulina, encontrando niveles mayores de IRS-1, IRS-1p, PI3K, Akt1p y Akt2p en hígado; así como un incremento de IRS-1, IRS-1p, IRS-2, IR β , Akt1 y GLUT4 en músculo de los ratones suplementados con el extracto de moringa rico en isotiocianatos.

Por su parte, Attakpa *et al.* (2017), por medio de análisis de inmunotransferencia, reportaron incrementos en la expresión de la vía Akt dependiente de insulina, así como en los niveles del transportador GLUT 4. Ambos parámetros fueron evaluados en el músculo de ratones con obesidad inducida de la cepa C57BL/6J, los cuales fueron tratados con un extracto acuoso de etanol elaborado con hojas pulverizadas de moringa.

Joung *et al.* (2017) informaron sobre la mejoría en la tolerancia a la glucosa en ratones obesos de la cepa C57BL/6, después de 8 semanas de suplementación en dieta con extracto metanólico fermentado de hojas de moringa. Además, los autores reportaron una disminución en la expresión de genes relacionados con marcadores de inflamación (IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α) en tejido adiposo, tejido muscular y en hígado.

Asimismo, Paula *et al.* (2017) evaluaron las propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes de un aislado proteico elaborado con hojas de moringa. Por medio de inyecciones intraperitoneales, ratones con diabetes tipo 1 fueron tratados con diferentes dosis del aislado proteico, reportando un incremento de la enzima catalasa en tejido hepático, así como una disminución de los niveles de glucosa sérica después de 7 días de tratamiento.

La capacidad insulino secretora de 4-hidroxifenilacetoneitrilo isotiocianato, fluoropirazina, 4-hidroxibenzoato de metilo, 4- α -L-ramnanosilosiloxibencilo y 3,4-dihidroxi benzonitrilo, compuestos presentes en el árbol de moringa, fue evaluada por Hafizur *et al.* (2018). Los resultados de dicho estudio sugirieron una fuerte secreción de insulina ejercida por el compuesto fluoropirazina, el cual, además, mejoró la función de las células β pancreáticas.

2.4. *Drosophila melanogaster*

2.4.1. Generalidades

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un insecto cuyo ciclo de vida corto, promedio de supervivencia entre 60 y 80 días, y su facilidad de manejo en el laboratorio, le han convertido en un modelo óptimo para la investigación de enfermedades relacionadas con el metabolismo, entre ellas la diabetes tipo 2 (Santalla *et al.*, 2016).

Con respecto a su morfología, el cuerpo de *Drosophila melanogaster* está formado de tres partes: cabeza (contiene órganos sensoriales), tórax (se encuentran las extremidades y las alas) y abdomen (donde se localiza el cuerpo graso, así como los genitales masculinos o femeninos). Además, por ser un insecto holometábolo, su ciclo de vida consta de cuatro estadios: huevo (etapa embrionaria), larva (constituido de tres estadios), pupa y adulto (Figura 2). Cabe señalar que sólo las larvas y las moscas adultas se alimentan activamente, siendo el estadio de larva la principal etapa de alimentación (Staats *et al.*, 2018).

Bajo condiciones controladas en laboratorio, el ciclo de vida de la mosca tiene una duración aproximada de 10 días, desde huevo hasta mosca adulta, cuando la crianza se realiza en un medio nutritivo a temperatura ambiente (25 °C) (Goenaga, 2010).

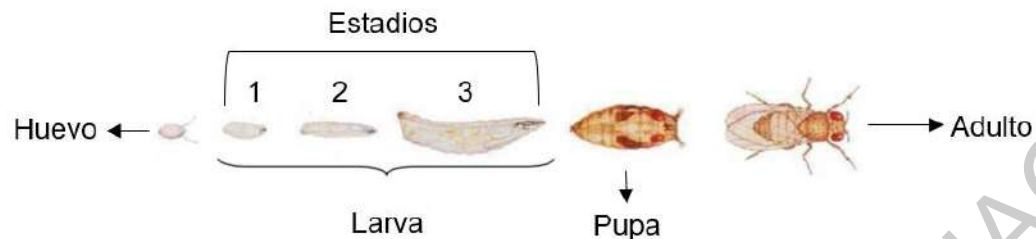


Figura 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Goenaga, 2010).

Se considera a *Drosophila melanogaster* como un organismo genético modelo para el desarrollo de investigaciones asociadas al metabolismo, crecimiento y proliferación; constituye, actualmente, una vía exitosa para la realización de experimentos gracias a la homología entre su genoma y el genoma humano (Otero-Moreno *et al.*, 2016).

En comparación con otras especies, algunas ventajas que presenta este modelo biológico son mayor control y homogeneidad de sus antecedentes genéticos (lo que favorece la reproducibilidad de resultados); posibilidad de evaluar parámetros en diferentes etapas de desarrollo (larva y adulto); evaluación de esperanza de vida; y, en el caso de modelos diabéticos, viabilidad de evaluar cambios en diferentes niveles de la vía insulínica (existen cepas con mutaciones en genes específicos de la cascada de señalización de la insulina) (Álvarez-Rendón *et al.*, 2018). Asimismo, este modelo presenta ventajas respecto a cuestiones éticas y económicas, siendo un organismo viable para la realización de investigaciones en todo el mundo (Santalla *et al.*, 2016).

Dado que la manipulación de *D. melanogaster* resulta ser sencilla, se han establecido metodologías genéticas, bioquímicas y moleculares para examinar respuestas celulares frente a señales externas, como la ingesta de nutrientes y de compuestos bioactivos (Staats *et al.*, 2018). Su alto grado de conservación evolutiva y bajo nivel de redundancia genética, así como la amplia caracterización de genes

implicados en la vía de la insulina y el metabolismo, hacen de *D. melanogaster* un sistema viable para el estudio de la ruta insulínica y efectos metabólicos (Dubnau, 2014; Álvarez-Rendón *et al.*, 2018).

2.4.2. Vía de la insulina en *Drosophila melanogaster*.

La señalización de insulina en la mosca se propaga por medio de los péptidos similares a la insulina (DILPs, por sus siglas en Inglés), los cuales se encuentran regulados por la alimentación y nutrición (Post & Tatar, 2016), ejerciendo su efecto sobre el crecimiento y el tamaño de la mosca adulta (Lee *et al.*, 2008). En total se han identificado ocho péptidos similares a la insulina (DILPs 1-8), de los cuales, DILP2 presenta una homología mayor con la insulina de vertebrados (Álvarez-Rendón *et al.*, 2018).

En general, los DILPs son secretados por células productoras de insulina (IPCs, por sus siglas en Inglés), similares a las células β del páncreas, localizadas en el sistema nervioso central de la mosca (Nüssli & Broeck, 2015; Staats *et al.* 2018). Cabe señalar que, a diferencia de los vertebrados, los DILPs en las moscas presentan funciones tanto insulínicas como funciones de factores de crecimiento de insulina (IGF) (Álvarez-Rendón *et al.*, 2018).

Al igual que en los vertebrados, la mosca de la fruta requiere de una cascada de fosforilaciones para que los DILPs lleven a cabo su función hipoglucemiante (Graham & Pick, 2017). Una vez que el insecto es alimentado a través de la dieta, ya sea controlada o no, los niveles de glucosa en la hemolinfa de la mosca incrementan. Cuando este fenómeno ocurre, las células productoras de insulina, localizadas en el cerebro de la mosca, captan la presencia de glucosa y liberan a los DILPs, principalmente DILP2 (Hietakangas & Lemaitre, 2017; Staats *et al.*, 2018).

Una vez liberados, los DILPs (1 al 7) se unen al receptor de insulina (*InR*) de la mosca, un receptor transmembranal que presenta actividad tirosina-quinasa. Dicho receptor se activa por fosforilación cruzada en sus residuos de tirosina, para posteriormente interactuar con el sustrato del receptor de la insulina, homólogo a los IRS1-4 humanos, conocido como *chico* en *D. melanogaster* (Post & Tatar, 2016). De esta forma, se crean sitios de unión que permiten la señalización de otras proteínas, como fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), la cual, mediante una serie de fosforilaciones, favorece el reclutamiento y activación de la proteína cinasa B (conocida como AKT) (Otero-Moreno *et al.*, 2016). AKT, una vez activa, actúa sobre los homólogos de la mosca implicados en el crecimiento y el metabolismo, entre ellos: Rheb (proteína necesaria para activar a mTOR), mTOR (quinasa de rapamicina), S6K (quinasa de la proteína S6 del ribosoma), *shaggy* (homólogo de glucógeno quinasa sintasa GSK-3 β) y el factor de transcripción dFOXO, un factor cuya activación favorece procesos catabólicos (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011).

2.4.3. Modelo *InR*.

En *D. melanogaster*, *InR* es el homólogo del receptor de la insulina y del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de mamíferos, el cual ejerce un efecto importante sobre el crecimiento y el desarrollo de la mosca (Brogiolo *et al.*, 2001).

En *D. melanogaster* ambos tipos de diabetes pueden ser inducidos, ya sea anulando la expresión de los péptidos similares a la insulina (dando como resultado diabetes tipo 1), o bien, realizando mutaciones en los componentes de la vía insulínica, entre ellos el receptor de la insulina, y modificando la dieta del insecto para inducir un estado de obesidad o hiperglucemia (ocasionando diabetes de tipo 2) (Álvarez-Rendón *et al.*, 2018). Manipulaciones genéticas sobre el receptor de insulina en *D. melanogaster*, cuyo gen se localiza en el brazo derecho del tercer cromosoma, dan como resultado fenotipos con una función disminuida en la vía de

la insulina (Chen *et al.*, 1996; Otero-Moreno *et al.*, 2016). Cabe señalar, sin embargo, que sólo los genotipos heteroalélicos débiles de *InR* son compatibles con la vida, pudiendo generar moscas adultas, pero con graves problemas de desarrollo (Brogiolo *et al.*, 2001).

Las cepas mutantes en el receptor de insulina suelen ser obesas, presentan menor tamaño, mayor contenido de lípidos y carbohidratos, así como alteraciones en el sistema nervioso y alteraciones circadianas (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011; Álvarez-Rendón & Riesgo-Escovar, 2020). En la Figura 3 se muestra la comparación entre el tamaño de una cepa silvestre (*yellow-white*) y la cepa *InR*.

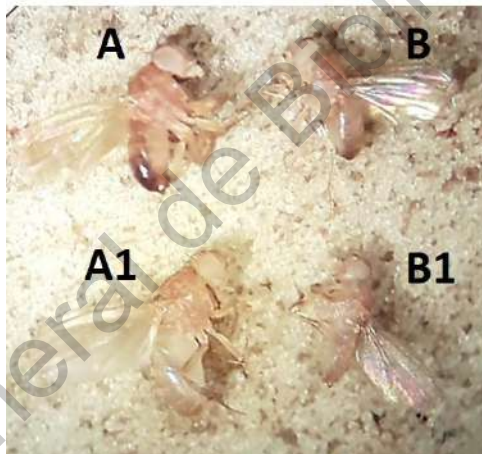


Figura 3. Comparación del tamaño corporal de macho (A) y hembra (A1) de cepa *yellow-white* vs macho (B) y hembra (B1) de cepa *InR*.

Manipulaciones genéticas que modifiquen la homeostasis metabólica de la mosca dan como resultado cambios en los niveles circulantes de carbohidratos, entre ellos la trehalosa (Matsuda *et al.*, 2015). En la mosca de la fruta, la glucosa proveniente de los alimentos se absorbe en el tracto digestivo y pasa directo al cuerpo graso (órgano análogo al tejido adiposo y al hígado de mamíferos). Una vez en el cuerpo graso, la glucosa se convierte en trehalosa por acción de la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (Yasugi *et al.*, 2017). La trehalosa es un azúcar no

reductor, el cual puede ser almacenado en forma de energía, o bien, puede ser liberado hacia la hemolinfa (Graham & Pick, 2017). Dado que los niveles de glucosa en los insectos suelen ser muy bajos, generalmente se considera la trehalosa como el carbohidrato principal que circula por la hemolinfa de las moscas (Reed *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2015).

La resistencia a la insulina conlleva a un estado de obesidad en *D. melanogaster* debido a una acumulación anormal de carbohidratos y lípidos totales respecto a su peso (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011). Además, en el cuerpo graso de la mosca se almacenan nutrientes, entre ellos los lípidos, cuando la cantidad de nutrientes es abundante. Dichos lípidos se almacenan en forma de triacilglicéridos (TAG), de manera que la cuantificación de TAG es un parámetro que permite definir el estado de obesidad en el insecto (Musselman & Kühnlein, 2018).

Por estos motivos, el modelo *Drosophila melanogaster*, mutante en *InR* (receptor de la insulina), se considera una opción viable para realizar investigaciones asociadas a diabetes mellitus tipo 2 (Post & Tatar, 2016; Graham & Pick, 2017; Álvarez-Rendón *et al.*, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la diabetes mellitus tipo 2 se ha establecido como un problema de salud pública de gran prevalencia, generando altos costos de inversión por parte de los pacientes, sus familias, y del sector salud. Dado que esta patología es una enfermedad hasta hoy incurable, cuyo tratamiento consiste en el control de la glucemia, se sugiere como terapia alternativa el consumo de alimentos o suplementos alimenticios con potencial hipoglucemiante. En este sentido, el consumo de plantas con propiedades funcionales y compuestos nutraceuticos como alternativa natural para ayudar a disminuir el riesgo a padecer enfermedades crónicas no transmisibles, favorece la calidad de vida de las personas.

Moringa oleifera actualmente es cultivada en diversos países gracias a su capacidad de crecer en climas tropicales y subtropicales. Las hojas de moringa se caracterizan, entre otras cosas, por poseer nutrientes como aminoácidos esenciales y carbohidratos. Contienen, además, fibra y compuestos fenólicos, así como glucosinolatos. Diferentes extractos de hojas enriquecidos en compuestos fenólicos y en isotiocianatos han demostrado actividad antiinflamatoria, antioxidante e hipoglucemiante. No obstante, el contenido de otros componentes en hojas enteras de moringa podría potenciar dichos efectos.

Por lo anterior, se propuso evaluar el efecto hipoglucemiante del consumo crónico de hojas de moringa en el modelo de *Drosophila melanogaster* mutante en el receptor de insulina (*InR*), así como su efecto regulatorio sobre parámetros asociados a la señalización de la insulina. Esto con la finalidad de elucidar el potencial hipoglucemiante del polvo de hojas de moringa para poder incluir su consumo como terapia coadyuvante en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto hipoglucemiante de hojas de moringa (*Moringa oleifera*) sobre el fenotipo de la mutante *InR* de *Drosophila melanogaster*.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la composición química, algunos compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de hojas de moringa (*Moringa oleifera*).
 - 1.1 Determinar el contenido de proteína, lípidos, humedad, cenizas y carbohidratos.
 - 1.2 Evaluar el contenido de algunos compuestos bioactivos como: fibra dietaria total (insoluble y soluble), compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), taninos condensados y glucosinolatos.
 - 1.3 Determinar la capacidad antioxidante del polvo de hojas de moringa.
2. Evaluar el efecto hipoglucemiante de hojas de moringa en la mutante *InR* de *Drosophila melanogaster*.
 - 2.1. Determinar los niveles de carbohidratos totales, glucosa y glucógeno de las moscas en estudio.
3. Determinar el efecto del consumo de hojas de moringa sobre algunos parámetros macroscópicos y fisiológicos asociados a alteraciones del receptor de insulina en la mutante *InR* de *Drosophila melanogaster*.
 - 3.1. Determinar la sobrevivencia de las moscas en estudio.
 - 3.2. Evaluar el cambio de peso de las moscas en estudio.
 - 3.3. Determinar los niveles de lípidos totales y triglicéridos de las moscas en estudio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Material biológico.

Las hojas de moringa (*Moringa oleifera*) se obtuvieron de la ciudad de Santiago de Querétaro, del estado de Querétaro (México).

Las cepas de *Drosophila melanogaster* (silvestres *yellow-white* y mutantes *InR*) provinieron del cepario de moscas del laboratorio de Genética de Transducción de Señales, donadas por el Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla. Dichas cepas fueron obtenidas del Institute of Molecular Systems Biology ETH, Zürich. Las características de dichas cepas se encuentran descritas en la plataforma digital Flybase (Flybase, 2019a; Flybase, 2019b).

5.1.2. Reactivos

Reactivos de uso general α -amilasa, proteasa, amilogucosidasa, peptidasa, (+)-catequina, vainillina, reactivo de Folin-Ciocalteu, tetracloropaladato de sodio, sinigrina, ácido propiónico, kit de glucosa (GAGO) y reactivo de antrona fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Company. Acetona, etanol, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, éter de petróleo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, acetato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, metanol, rojo de metilo, persulfato de potasio y verde de bromocresol fueron adquiridos de J.T. Baker.

Para la preparación del alimento de las moscas se utilizaron insumos donados por el laboratorio de Genética de Transducción de Señales del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla.

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterización química de hojas de *Moringa oleifera*.

La cantidad de proteína, lípidos, humedad y cenizas se determinó empleando la metodología descrita por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2002.

5.2.1.1. Cuantificación de proteína (Técnica 920.87).

Se realizó la cuantificación de proteína por digestión de muestras, seguida de destilación. Se pesaron 0.5 g de muestra y se agregaron a tubos Kjeldhal junto con 3.5 g de Na₂SO₄, 0.4 g de CuSO₄ y 15 mL de H₂SO₄. Se colocaron los tubos con las muestras en el digestor y se llevaron a una temperatura de 360-420 °C, incrementando la temperatura gradualmente. Una vez observado un cambio de color a verde claro en las muestras, se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se les adicionó 100 mL de agua destilada. Para proceder con la destilación, se colocaron los tubos Kjeldahl en el equipo (destilador) y se adicionaron 50 mL de NaOH al 40 %. El destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer previamente preparado con 25 mL de H₃BO₃ al 4 %, utilizando rojo de metilo y verde de bromocresol como indicador. Una vez realizada la destilación, se tituló con HCl 0.1 N. Para la determinación del nitrógeno total se empleó 6.25 como factor de conversión equivalente al porcentaje de proteína contenida en la muestra.

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{[(A)(B)]}{C} * 0.014 \times 100$$

Donde:

A = mL gastados de ácido

B = Normalidad del ácido

C = gramos de la muestra

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times 6.25$$

5.2.1.2. Cuantificación de lípidos (Técnica 920.39).

En cartuchos de celulosa (desgastados) se pesaron 3 g de muestra en base seca. Se adicionaron 100 mL de éter de petróleo en matraces Soxhlet y se colocaron los cartuchos dentro del equipo (extractor Soxhlet). Se realizó la extracción de lípidos durante 5-6 horas a 180 °C. Después de este tiempo, se evaporó el residuo de éter y se colocaron los matraces en la estufa a 80 °C durante 6 horas. Por último, se atemperaron los matraces en el desecador y finalmente se realizó el cálculo de lípidos por diferencia de peso.

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

5.2.1.3. Cuantificación de humedad (Técnica 925.10).

Se pesaron 2 g de muestra en charolas taradas previamente. Se colocaron las muestras a 130 °C en la estufa durante 2 horas. Pasadas las 2 horas, se retiraron las muestras de la estufa y se llevaron al desecador para su enfriamiento. Finalmente, se pesaron las muestras. Para realizar el cálculo de humedad se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso inicial de la muestra} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial de la muestra}} * 100$$

5.2.1.4. Cuantificación de cenizas (Técnica 923.03).

En una cápsula de porcelana, previamente tarada, se pesaron 2 g de muestra. La muestra se incineró y se llevó durante 4 horas a la mufla a una temperatura de 550 °C. Se retiraron las cápsulas de la mufla y se colocaron en un desecador hasta su enfriamiento. Se pesaron las cápsulas con las cenizas y el contenido total se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = [(\text{Peso final} - \text{peso inicial}) / \text{Peso de la muestra}] * 100$$

El resultado se expresó en base seca.

5.2.1.5. Cuantificación de carbohidratos.

El contenido de carbohidratos de la muestra se realizó por diferencia de peso, considerando el porcentaje de las determinaciones señaladas anteriormente.

5.2.2. Determinación de compuestos bioactivos.

5.2.2.1. Fibra dietaria.

La fibra dietaria total se determinó mediante la suma de fibra insoluble y fibra soluble.

5.2.2.1.1. Fibra insoluble.

La determinación de fibra insoluble se realizó por el método propuesto por Shiga *et al.* (2003).

Se pesó 1 g de muestra pulverizada y desgrasada y se colocó en un matraz Erlenmeyer, protegido de la luz, al cual se agregaron 50 mL de tampón de fosfato 0.08 M a pH 6. Acto seguido, se adicionaron 100 μ L de α -amilasa. Se incubó el matraz Erlenmeyer en baño María a 95 °C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos hasta completar el tiempo. Terminada la incubación, se ajustó el pH a 7.5 utilizando NaOH y se adicionaron 100 μ L (5 mg/mL) de proteasa, para volver a incubar a baño María a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos con agitación continua. Pasados los 30 minutos, se dejó atemperar la muestra y nuevamente se ajustó el pH a 4 empleando HCl. Posteriormente, se adicionaron 300 μ L de amiloglucosidasa y se incubó a 60 °C durante 30 minutos, agitando continuamente. Finalizando la incubación, se filtró la muestra en papel Whatman No. 4, previamente pesado. Se realizaron dos lavados empleando 15 mL de agua destilada a una

temperatura de 60 °C y otros dos lavados con 15 mL de etanol al 80 %. Se llevó el papel filtro a peso constante a 60 °C durante 24 horas y, finalmente, se registró su peso.

La diferencia registrada en el peso del papel filtro fue atribuida a la fracción de fibra insoluble (residuo presente en el filtro).

$$\% \text{ Fibra insoluble} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_3} \times 100$$

Donde:

W_1 = Peso del papel filtro con la muestra (gramos)

W_2 = Peso del papel (gramos)

W_3 = Peso de la muestra (gramos)

5.2.2.1.2. Fibra soluble.

Una vez determinada la fibra insoluble, se conservó el residuo filtrado y se añadió un volumen igual de etanol 80 %. Se dejó en reposo por 24 horas a 4 °C y, pasado este tiempo, se filtró en papel Whatman No. 42 previamente pesado. Acto seguido, se realizaron dos lavados con 15 mL de etanol 80 %, seguidos de otros dos lavados con 15 mL de acetona. Se dejó secando el papel filtro durante 24 horas a 60 °C y se registró su peso.

$$\% \text{ Fibra soluble} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_3} \times 100$$

Donde:

W_1 = Peso del papel filtro con la muestra (gramos)

W_2 = Peso del papel (gramos)

W_3 = Peso de la muestra (gramos)

5.2.3. Determinación de compuestos fenólicos.

5.2.3.1. Obtención de extracto metanólico.

Para la obtención del extracto se siguió la metodología propuesta por Saura-Calixto *et al.* (2007). Se pesaron 0.25 g de hojas de moringa previamente secadas y tamizadas. Se adicionaron 10 mL de metanol 50 % y se dejó la muestra en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante en un frasco ámbar y al sedimento se le realizó una segunda extracción con 10 mL de acetona 70 %, seguido de agitación (1 hora) y centrifugación bajo las mismas condiciones. Se recuperó el sobrenadante junto con el sobrenadante de la primera extracción y se filtró el extracto usando discos de 0.45 µm. El extracto obtenido se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

5.2.3.2. Cuantificación de fenoles totales.

Se realizó la cuantificación de fenoles totales siguiendo la metodología propuesta por Singleton *et al.* (1999). Se tomaron 50 µL de extracto metanólico a los que se les adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) y se neutralizó la reacción con 625 µL de Na₂CO₃. Se incubó por 2 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, y se realizó la cuantificación de fenoles en espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Los valores obtenidos se compararon contra una curva de calibración de ácido gálico (0-80 µg/mL). El contenido de fenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca.

5.2.3.3. Cuantificación de flavonoides.

Para la cuantificación de flavonoides se empleó la metodología descrita por Oomah *et al.* (2005) con adaptación a microplaca. Se mezclaron 50 µL de extracto metanólico con 180 µL de agua destilada y con 20 µL de solución 2-aminoetildifenilborato al 1 % en metanol. Se analizaron las muestras a una longitud

de onda de 404 nm en MULTISKAN y los valores se compararon contra una curva estándar de rutina con intervalo de 0-100 µg/mL. Se reportó la concentración de flavonoides como mg equivalentes de rutina por gramo de muestra seca.

5.2.3.4. Cuantificación de taninos condensados.

Se empleó la metodología descrita por Desphande & Cheyran (1987) con adaptación a microplaca propuesta por Feregrino-Pérez *et al.* (2008). Se agregaron 50 µL de extracto metanólico en los pozos de la microplaca y se adicionaron 200 µL de reactivo de vainillina 1 % - HCl 8 % (1:1). Se realizó el análisis de las muestras a una longitud de onda de 540 nm en MULTISKAN. Se compararon los valores obtenidos contra una curva estándar de (+)-catequina con un intervalo de 0-1 mg/mL. La cuantificación de taninos condensados se expresó como mg equivalentes de (+)-catequina/g de muestra.

5.2.3.5. Determinación de glucosinolatos (HPLC).

El contenido de glucosinolatos se determinó siguiendo la metodología descrita por Förster *et al.* (2015). Se realizó un extracto de metanol empleando 20 mg de muestra liofilizada y 750 µL de metanol 70 %. Se añadieron 100 µL de 2-propenil glucosinolato 1 mM y se calentaron las muestras en un termo mezclador a 80 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 16000 x g durante 10 minutos y se recolectaron los sobrenadantes. El sedimento se extrajo dos veces más con 500 µL de metanol al 70 % durante 5 minutos.

Los sobrenadantes resultantes se colocaron en un concentrador de vacío a un volumen de 150 µL, se añadieron 200 µL de $C_4H_6BaO_4$ (0.4 M) a cada tubo y se completaron hasta 1 mL con agua ultra pura. Las muestras se incubaron por 30 minutos a 25 °C y posteriormente se centrifugaron a 16000 x g por un tiempo de 10 minutos. Terminada la centrifugación, los sobrenadantes se decantaron y se completaron hasta 2 mL con agua ultra pura. Acto seguido, se filtró 1 mL de cada

muestra utilizando tubos de microcentrífuga y se transfirieron los filtrados a viales de HPLC. Para el análisis en HPLC se inyectaron 10 μ L de muestra en una columna de 4.6 x 250 mm SB-C18 y se realizó la elución a un caudal de 1.5 mL/min utilizando como solvente A 100 % de acetato de amonio 0.1 M y como solvente B 40 % de acetonitrilo / 60 % acetato de amonio 0.1 M. La elución se llevó a cabo por medio del siguiente gradiente: 0–2 min: 0–1 % B, 2–20 min: 1–50 % B, 20–24 min: 50–100 % B, 24–26 min: 100 % B, 26–27 min: 100–1 % B, y 27–35 min: 1–0 % B. La detección de los componentes se realizó a 229 nm y su identificación se determinó a partir del tiempo de retención. La cuantificación de estos compuestos fue determinada por medio de una curva estándar de sinigrina en un intervalo de 0–2 μ M; los resultados se expresaron como mg equivalentes de sinigrina/g de muestra seca.

5.2.3.6. Determinación de glucosinolatos (espectrofotometría).

Se siguió la metodología descrita por Mawlong *et al.* (2017) con adaptaciones para determinación de glucosinolatos en hojas de moringa por Leone *et al.* (2018). Se realizó un extracto metanólico empleando 50 mg de muestra liofilizada en 1 mL de metanol 70 %. La muestra se incubó a 80 °C durante 15 minutos; acto seguido, se centrifugó a 3000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. La extracción se realizó dos veces hasta completar 2 mL de extracto. Se tomaron 100 μ L de extracto y se añadieron 300 μ L de agua HPLC y 3 mL de tetracloropaladato de sodio 2 mM. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente; terminada la incubación, se agregó a una microplaca de 96 pozos, por triplicado. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 425 nm.

La cuantificación de glucosinolatos se realizó por medio de una curva estándar de sinigrina en un intervalo de 0–2 μ M y los resultados se expresaron como mg equivalentes de sinigrina/g de muestra seca.

5.2.4. Determinación de capacidad antioxidante.

5.2.4.1. Capacidad antioxidante por método DPPH.

La capacidad antioxidante por el método DPPH se realizó conforme a la técnica propuesta por Fukumoto & Mazza (2000).

Se agregaron 20 μL de muestra (extracto metanólico) y 200 μL de solución DPPH previamente preparada en una microplaca de 96 pozos, junto con un control de 20 μL de metanol y 200 μL de solución DPPH. Las muestras y el control se prepararon por triplicado y se leyeron cada 0, 4, 10, 30, 60 y 90 minutos a una longitud de onda de 520 nm en un lector de Elisa. Entre cada lectura, la microplaca se mantuvo a temperatura ambiente (25 °C) protegida de la luz. Para comparar los valores resultantes se utilizó como estándar una curva de calibración con Trolox (0-800 μM).

La actividad antirradical (ARA) se determinó como porcentaje de inhibición de DPPH, por medio de la ecuación descrita por Burda y Oleszek (2001):

$$\% \text{ ARA} = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}$$

Donde:

ARA = Actividad antirradical

Amuestra = Absorbancia de la muestra (520 nm)

Acontrol = Absorbancia del control (520 nm)

Se expresaron los resultados como capacidad antioxidante en μmol equivalentes de Trolox/g de muestra seca.

5.2.4.2. Capacidad antioxidante por método ABTS.

Se realizó la determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS siguiendo la técnica descrita por Nenadis *et al.* (2004) utilizando una microplaca de 96 pozos.

Se preparó una solución acuosa de ABTS 7 mM y una solución de persulfato de potasio 140 mM. Se mezclaron 5 mL de ABTS y 88 μ L de $K_2S_2O_8$ y se incubó la mezcla por 12 horas (protegida de la luz) para la generación del radical. Terminado el tiempo de incubación, se realizó una dilución adicionando 500 μ L de la solución incubada con 20-25 mL de etanol. La solución se leyó a una longitud de onda de 734 nm y se reportaron valores de absorbancia entre 0.7 y 0.99. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron, por triplicado, 20 μ L de extracto metanólico y un control con sólo 20 μ L de metanol. A cada muestra y control se agregaron 230 μ L de ABTS y se leyó la placa a una longitud de onda de 734 nm. Se utilizó una curva de calibración de Trolox (0-800 μ M) como estándar para realizar la comparación de los valores. Los resultados se expresaron como la actividad antirradical (% ARA) y como μ mol equivalentes de Trolox/g muestra seca.

5.2.5. Ensayo de *Drosophila melanogaster* (mutantes *InR* y controles *yw*).

Inicialmente se obtuvieron las cruzas de moscas correspondientes para el modelo experimental (mutantes *InR* y controles silvestres *yellow-white*). En el caso de mutantes *InR*, se realizó la crusa entre hembras y machos heterocigotos, mutadas en diferentes alelos del mismo gen, para obtener moscas heteroalélicas viables (*InR^{E19}/InR^{3T5}*).

Se realizó una puesta de embriones de 20 horas, tanto para cepas silvestres (*yellow-white*) como para cepas mutantes (*InR*). Para las cepas mutantes se colocaron 100 hembras vírgenes *InR^{E19}/Tm3-GFP* y 100 machos *InR^{3T5}/Tm3-GFP* (GFP: proteína verde fluorescente; Figura 4) en una cámara de puesta de huevos para permitir la crusa de dichas moscas. Pasadas las 20 horas, se recolectaron los

embriones y se colocaron en los diferentes tipos de dieta (alimento estándar y alimento estándar suplementado con polvo de hojas de moringa en cantidades de 0.5, 1.5, 2.5, 4.0 y 5.5 %), considerando 100 embriones para cada tratamiento. En el caso de los embriones de la cepa *InR*, se seleccionaron aquellos que fueran heteroalélicos, es decir, embriones que no expresaran a GFP.

Una vez transferidos los huevos en las diferentes dietas con y sin moringa, se incubaron los viales con los embriones a temperatura ambiente (25 °C) y se registró tanto el número de pupas como el número de adultos que eclosionaron de cada tratamiento.

Para la realización de experimentos, se consideraron moscas vírgenes de ambos sexos de 4-5 días post eclosión; se registró la información fenotípica, sexual, metabólica y estadística de la primera generación de moscas mutantes en el receptor de insulina (*InR^{E19}/InR^{3T5}*). La información obtenida de las moscas mutantes *InR^{E19}/InR^{3T5}* fue comparada contra su control silvestre (*yellow-white*).

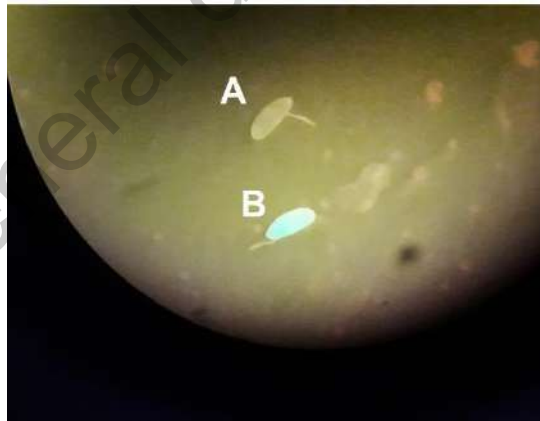


Figura 4. Huevos de *Drosophila melanogaster*: (A) huevo heteroalélico, no expresa GFP; (B) huevo heterocigoto, expresando GFP.

Las moscas se incubaron en viales de vidrio de 2 cm de diámetro x 10 cm de altura (aproximadamente 25 moscas por tubo) y se alojaron en el laboratorio D-04 del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla (Querétaro). La

temperatura a la cual se cultivaron los viales con las moscas fue de 25 °C, con una humedad relativa de 50 % en un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Las moscas fueron expuestas a un riesgo mínimo: suministro *ad libitum* de alimento estándar (piloncillo, levadura y agar) y alimento estándar suplementado con cantidades determinadas de polvo de hojas de moringa. Todos los viales contenían 10 mL de alimento, además, estuvieron identificados con el nombre de la cepa y la fecha de puesta de las moscas.

Para la observación de las características fenotípicas de las moscas, éstas fueron colocadas sobre una placa exclusiva para su anestesia y analizadas bajo un estereoscopio. Se analizaron grupos de 20 moscas de cada cepa, aproximadamente, durante 10-15 minutos. Para su anestesia, las moscas fueron expuestas a dosis constantes de CO₂ grado medicinal (pureza mínima 99.00 %). El CO₂ estuvo contenido en un tanque presurizado, el cual burbujeó la corriente de CO₂ a través de agua contenida en un matraz de vidrio para asegurar un alto grado de humedad relativa. Dicha corriente de CO₂ fue transferida a la placa para anestesiarse a las moscas a través de una manguera, de manera que las moscas fueron anestesiadas por contacto. Se cuidó el bienestar de las moscas durante la inducción de anestesia, así como durante su análisis (MacMillan *et al.*, 2017).

Después de su análisis, se seleccionaron las moscas necesarias para los estudios pertinentes (mutantes *InR^{E19}/InR^{3T5}*; controles *yw*). Las moscas cuyo ciclo de vida llegó a su fin fueron desechadas en una solución de etanol 70 %.

Los tubos con alimento en condiciones inadecuadas (alimento seco, agrietado o contaminado) fueron retirados para su lavado y esterilización. Los residuos biológicos generados durante la experimentación fueron desechados según lo establecido por la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Los residuos químicos fueron manejados conforme a las recomendaciones establecidas en la NOM-052-SEMARNAT-2005 y al manual para el manejo de los residuos peligrosos de tipo químico (CRETI) (Secretaría de Salud, 2011).

5.2.5.1. Preparación de alimento.

En la Figura 5 se muestran las diferentes dietas a las que fueron sometidas las moscas en estudio, desde su etapa larvaria hasta su etapa adulta de 4-5 días post eclosión.



Figura 5. Dieta estándar y dieta estándar suplementada con diferentes concentraciones de polvo de hojas de moringa (PHM).

DE: Dieta estándar; **A:** DE + 0.5 % PHM; **B:** DE + 1.5 % PHM; **C:** DE + 2.5 % PHM; **D:** DE + 4.0 % PHM; **E:** DE + 5.5 % PHM.

Para la preparación del alimento se utilizaron hojas de moringa recolectadas en el mes de Julio de 2019, provenientes del estado de Querétaro; las hojas fueron secadas (secado en horno a 40 °C durante 6.5 horas), molidas y tamizadas (tamiz malla 60). El polvo obtenido para preparar el alimento se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Para la preparación de la dieta estándar se utilizó piloncillo (10 %), levadura (10 %), agar (1.6 %) y se añadió ácido propiónico como conservador. La dieta estándar se suplementó con diferentes cantidades de PHM (0.5, 1.5, 2.5, 4.0 y 5.5 %) y se repartió en viales en una concentración de 10 mL/vial. Todos los viales se mantuvieron a una temperatura de 4 °C hasta su uso.

5.2.6. Medición de parámetros metabólicos.

5.2.6.1. Determinación de carbohidratos totales.

Se cuantificaron carbohidratos totales por medio de la técnica descrita por Van Handel (1985a). Se emplearon moscas vírgenes de ambos sexos y ambas cepas, de 4-5 días post eclosión. Las moscas, previamente congeladas y pesadas, se homogenizaron individualmente en 100 μ L de etanol 25 % utilizando un pistilo de plástico. Los sobrenadantes del homogenado se transfirieron a tubos limpios y se agregaron 2.4 mL de reactivo de antrona a cada tubo, se mezclaron las soluciones y se calentaron a 92 °C durante 17 minutos.

El contenido de carbohidratos se determinó empleando una curva estándar de glucosa con concentración de 500 μ g/1 mL de etanol 25 % empleando un lector Elisa a una longitud de onda de 625 nm.

5.2.6.2. Determinación de glucosa.

Se siguió la técnica de Tennessen *et al.* (2014). Se seleccionaron aleatoriamente moscas (hembras y machos vírgenes) de 4-5 días post eclosión de cada tratamiento. Las moscas se homogenizaron, individualmente, en 100 μ L de tampón de fosfato salino (PBS) y se dejaron incubando durante 10 minutos a 70 °C. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos a 4 °C. Acto seguido, se recuperaron 30 μ L de sobrenadante de cada muestra y se transfirieron a una placa de 96 pozos. Se añadieron 100 μ L de reactivo de glucosa (GAGO-Sigma Aldrich) y se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 minutos. Terminada la incubación, las muestras se leyeron a una longitud de onda de 540 nm.

Se compararon los valores resultantes utilizando una curva estándar de glucosa (glucosa 1 mg/mL en PBS) tratada bajo las mismas condiciones que las muestras.

5.2.6.3. Determinación de glucógeno.

Se determinó la cantidad de glucógeno según la metodología descrita por Tennessen *et al.* (2014).

Se homogenizaron, individualmente, moscas adultas de cada tratamiento (hembras y machos vírgenes) de 4-5 días post eclosión en 100 µL de PBS. Se incubaron las muestras a 70 °C durante 10 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 3 minutos a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se recuperaron 30 µL de sobrenadante de cada muestra y se transfirieron, por duplicado, a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Al primer tubo se agregaron 10 µL de PBS y al segundo se añadieron 10 µL de solución de amiloglucosidasa. Se dejaron incubando los tubos por 60 minutos a 37 °C y, pasada la incubación, se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 minuto a 20 °C. Acto seguido, se transfirieron 30 µL de sobrenadante de cada tubo a una placa de 96 pozos, se añadieron 100 µL de reactivo de glucosa y se dejó la placa en incubación durante 30 minutos a 37 °C. Finalmente, las muestras se leyeron a una longitud de onda de 540 nm. Los niveles de glucosa y glucógeno fueron determinados utilizando una curva estándar de glucosa (1 mg/mL) y glucógeno (1 mg/mL), respectivamente. La cantidad de glucógeno fue determinado por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Glucógeno} = (\text{Concentración de glucosa} + \text{glucógeno}) - \text{Glucosa}$$

5.2.7. Determinación de parámetros asociados a alteraciones del receptor de insulina.

5.2.7.1. Determinación de sobrevivencia (pupas y adultos).

Se determinó el porcentaje de pupas y adultos de acuerdo con la metodología descrita por Lozinsky *et al.* (2013). Después de la puesta de huevos de 20 horas, se recolectaron huevos (silvestres y mutantes) y se transfirieron a viales con alimento estándar (control) o alimento suplementado con polvo de hojas de moringa

(se colocaron 25 huevos por vial, completando un total de 100 huevos por tratamiento). Se dejaron los viales en incubación y se registró el número de pupas hasta la eclosión de moscas adultas. El número total de moscas adultas se determinó diariamente hasta 5 días posteriores de la 1ª eclosión registrada.

5.2.7.2. Determinación de peso.

Se realizó la medición del peso de acuerdo con Böhni *et al.* (1999). El cuerpo de hembras y machos de 5 días post eclosión se pesó en forma individual utilizando una microbalanza Cahn C-31 en un rango de 0.1 µg a 25 mg.

5.2.7.3. Extracción y determinación de lípidos totales.

La extracción y determinación de lípidos totales se realizó de forma individual siguiendo la técnica descrita por Van Handel (1985b).

Se emplearon 10 moscas adultas, de ambos sexos, de 4-5 días post eclosión. Las moscas, previamente congeladas a -70 °C, se seleccionaron aleatoriamente y se colocaron en tubos de ensaye a 90 °C durante una hora. Las muestras se dejaron enfriar y se homogenizaron con 500 µL de cloroformo-metanol (1:1). Se transfirió el sobrenadante a un tubo de ensaye limpio y se calentó a 100 °C durante 30 minutos para evaporar el solvente. Acto seguido, se adicionaron 200 µL de ácido sulfúrico concentrado (95-98 %) y se volvieron a calentar los tubos con las muestras durante 10 minutos a 100 °C. Terminado el calentamiento, se atemperaron las muestras, se agregaron 2.4 mL de solución de vainillina-ácido fosfórico a cada tubo de ensaye y se dejaron en incubación durante 10 minutos.

Enseguida, se realizó la lectura de las muestras a una longitud de onda de 490 nm en un lector Elisa, empleando como estándar una curva con aceite vegetal comercial en solución de 1 mg/mL en cloroformo.

5.2.7.4. Extracción y determinación de triglicéridos.

Se siguió la metodología descrita por Palanker *et al.* (2009). Se emplearon moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión, hembras y machos de ambas cepas. Las moscas se homogenizaron en 100 μ L de PBS (frío), 0.05 % Tween-20 y se incubaron a 70 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 20 μ L de PBS o reactivo de triglicérido y se volvió a dejar en incubación a 37 °C durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm por 3 minutos. Acto seguido, se transfirieron 30 μ L de muestra a una microplaca de 96 pozos y se dejaron incubando con 100 μ L de reactivo libre de glicerol durante 5 minutos a 37 °C. Finalmente, se realizó la lectura de las muestras a una longitud de onda de 540 nm.

5.3. Análisis estadístico.

Todos los experimentos con hojas de moringa fueron llevados a cabo por triplicado y se reportaron los resultados como la media \pm la desviación estándar. Para pruebas no paramétricas, se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis, reportando la comparación de medias \pm el error estándar. Se aplicó la prueba post-hoc de Tukey para realizar las comparaciones múltiples de los diferentes tratamientos con moringa y se empleó la prueba de Dunnet para comparar resultados contra un control. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico JMP (versión 8.0).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización química y compuestos bioactivos de hojas de moringa (*Moringa oleifera*).

En el Cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos de la composición química y algunos compuestos bioactivos presentes en las hojas de moringa, las cuales fueron secadas en horno a 40 °C en un lapso de 6.5 horas.

Cuadro 6. Contenido de la composición química y compuestos bioactivos de la muestra de hojas de moringa.

Composición química (%)	
Proteína	29.34 ± 0.25
Lípidos	4.44 ± 0.14
Cenizas	9.15 ± 0.28
Humedad	6.65 ± 0.42
Carbohidratos ¹	49.96 ± 0.80
Compuestos bioactivos	
Fibra dietaria total ²	30.15 ± 0.30
Fibra dietaria insoluble ²	26.41 ± 0.37
Fibra dietaria soluble ²	3.74 ± 0.12
Fenoles totales (libres) ³	46.23 ± 0.53
Flavonoides totales (libres) ⁴	29.79 ± 0.41
Taninos condensados ⁵	3.12 ± 0.65
Glucosinolatos (HPLC) ^{6*}	29.49 ± 1.48
Glucosinolatos totales (espectrofotometría) ^{6*}	28.71 ± 0.62

Los resultados son la media de tres réplicas ± la desviación estándar; los valores son expresados en base seca.

¹Calculado por diferencia; ²expresado en porcentaje; ³mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra; ⁴mg equivalentes de rutina/g de muestra; ⁵mg equivalentes de (+) catequina/g de muestra; ⁶mg equivalentes de sinigrina/g de muestra; *determinado en muestra liofilizada.

El porcentaje de proteína resultó ser mayor al reportado por Olson *et al.* (2016) quienes caracterizaron hojas provenientes de la costa de Jalisco, México. Por el contrario, el resultado reportado en el presente trabajo mostró valores inferiores a los reportados por Castillo-López *et al.* (2017), quienes reportaron porcentajes de proteína en un intervalo de 31.69-36.83 % referente a hojas de moringa del norte de México. Otros autores han reportado contenido proteico en hojas de moringa alrededor de 22.87 y 25.40 % para muestras provenientes de África y Asia, respectivamente (Agamou *et al.*, 2015; Abdulkadir *et al.*, 2016). Las diferencias se pueden atribuir a las condiciones climáticas y al sitio de cultivo (Bridgemohan *et al.*, 2020). Cabe señalar que el contenido proteico de las hojas de moringa ha sido sugerido por su función para combatir problemas de malnutrición (Tshingani *et al.*, 2017); además, la cantidad de proteína en la dieta influye en el correcto desarrollo y la sobrevivencia de la mosca de la fruta (Jang & Lee, 2018).

Se han reportado valores de lípidos para hojas de moringa alrededor 4.67, 8.5 y 10.26 % en zonas de Grecia, centro de África y centro-norte de México, respectivamente (Valdez-Solana *et al.*, 2015; Agamou *et al.*, 2015; Lalas *et al.*, 2017). Los valores reportados para la muestra analizada en el presente trabajo no sobrepasan el contenido reportado por otros autores. Resulta de interés el contenido lipídico ya que, de acuerdo con algunos autores, en las hojas de moringa destaca la presencia de los ácidos grasos linoleico, α -linoleico y esteárico (Moyo *et al.*, 2011); dichos ácidos grasos mejoran el metabolismo celular por medio de procesos antiinflamatorios y el mejoramiento de la vía de señalización de la insulina (Palomer *et al.*, 2018; Senyilmaz-Tiebe *et al.* 2018).

Lalas *et al.* (2017) reportaron que las hojas de moringa también contienen elementos de importancia biológica como calcio, potasio, magnesio y hierro, principalmente, y una medida indirecta de éstos es el contenido de cenizas. En lo que refiere al contenido de cenizas, el porcentaje reportado en la presente caracterización se encontró dentro del rango informado por otros autores para hojas

del estado de Oaxaca (8.5 %) y hojas del estado de Hidalgo (11.22 %) (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2015; Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018). Las diferencias entre el contenido de cenizas respecto a otros estados en México podrían explicarse debido al grado de madurez (hojas maduras) y a las condiciones climáticas de la ciudad (hojas recolectadas en verano), ya que se ha demostrado que ambos factores pueden influir en el contenido final de macro y micronutrientes (Amaglo *et al.*, 2010; Agamou *et al.*, 2015).

En cuanto al porcentaje de humedad, éste coincidió con el reportado por Castillo-Lopez *et al.* (2017), en un intervalo de 6.56 a 8.03 %, referente a hojas de moringa del estado de Sinaloa; sin embargo, fue inferior a los valores 10.16 - 14.27 % reportados por Cuellar-Nuñez *et al.* (2018) quienes caracterizaron hojas del estado de Hidalgo. Nuevamente, las condiciones climáticas y de humedad de cada estado pudieron ejercer un impacto en el resultado final.

Respecto al contenido de carbohidratos, Castillo-Lopez *et al.* (2017) reportaron 41.29 ± 0.54 %, mientras que Melo *et al.* (2013) informaron 51.66 % para hojas de los estados de Sinaloa y de Michoacán, respectivamente. El porcentaje reportado en el presente trabajo está dentro de los valores de dichos autores. Dado que el contenido de carbohidratos fue determinado por diferencia respecto a los otros macro y micronutrientes presentes en las hojas de moringa, variaciones en el contenido de humedad pueden ejercer diferencias en el contenido total de los hidratos de carbono.

El contenido de fibra total que presentó la muestra analizada fue superior a los valores reportados por otros autores que han caracterizado hojas de moringa de diferentes estados de México, encontrando porcentajes de fibra total en el rango de 15-28 %, aproximadamente (Melo *et al.*, 2013; Valdez-Solana *et al.*, 2015; Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018). Destaca, principalmente, el contenido de fibra insoluble que resultó ser mayor al reportado por Agamou *et al.* (2015); mientras que el contenido

de fibra soluble fue similar al reportado por Caicedo-Lopez *et al.* (2019). Resulta de interés el contenido de fibra total ya que se ha indicado que el consumo de fibra dietaria, principalmente la fracción soluble, retarda la absorción de glucosa a nivel intestinal, reduciendo así niveles elevados de glucemia posprandial (Weickert & Pfeiffer, 2018). Además, se ha sugerido que el consumo de fibra soluble promueve la saciedad en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, favoreciendo la reducción en la ingesta de alimento (Abutair *et al.*, 2018).

El contenido de fenoles totales (libres) reportado en el presente trabajo fue mayor al reportado para hojas de moringa del estado de Hidalgo (32.75 ± 0.07 mg equivalentes de ácido gálico/g en muestra seca), de acuerdo con Caicedo-Lopez *et al.* (2019). Asimismo, el valor de fenoles totales de la muestra fue similar al contenido fenólico informado por Ademiluyi *et al.* (2018) de 46.88 ± 1.42 mg equivalentes de ácido gálico/g en muestra seca.

El total de flavonoides (libres) en la muestra analizada representó aproximadamente el 64 % del total de los compuestos fenólicos; se encontraron valores inferiores a los reportados por Mukunzi *et al.* (2011) y Caicedo-Lopez *et al.* (2019), quienes reportaron 39.08 ± 0.87 y 42.64 ± 2.76 mg equivalentes de rutina/g en muestra seca, respectivamente. La menor concentración de los valores de flavonoides totales de la muestra analizada respecto a otros reportes pudo ser debida a la temperatura de secado de la muestra (secado en horno a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$). En este sentido, Ademiluyi *et al.* (2018) caracterizaron extractos acuosos de hojas de moringa secadas por: liofilización, temperatura ambiente, secado al sol y secado en horno ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$), informando una concentración menor de casi el 50 % en el contenido total de flavonoides en la muestra secada en horno en comparación con la muestra secada a temperatura ambiente. Los autores atribuyeron esta disminución a la degradación de los compuestos fenólicos como consecuencia de las altas temperaturas.

Además de ejercer un efecto antioxidante, se ha demostrado que extractos acuosos y metanólicos de hojas de moringa ricos en compuestos fenólicos son capaces de inhibir *in vitro* a las enzimas intestinales α -amilasa y α -glucosidasa de manera dosis-dependiente (Jimoh, 2018; Magaji *et al.*, 2020), retardando así la degradación de carbohidratos complejos hacia glucosa y su posterior absorción hacia el tubo intestinal.

Se ha identificado la presencia de algunos factores anti nutricios en las hojas de moringa, entre ellos los taninos condensados. En la muestra analizada se encontró un bajo contenido de estos compuestos en comparación con otros compuestos fenólicos; sin embargo, el resultado fue similar al reportado por Adisakwattana & Chanathong (2011) quienes reportaron 4.90 ± 0.20 mg equivalentes de (+) catequina/g muestra seca.

Las hojas de moringa se distinguen principalmente por su contenido de glucomoringina. Generalmente, el contenido de algunos compuestos tiende a ser mayor cuando es determinado por técnicas espectrofotométricas, debido al acoplamiento de otras moléculas con los metabolitos en estudio. En el presente trabajo se observó el efecto contrario: por espectrofotometría se determinó un contenido menor de glucosinolatos en comparación con la determinación por HPLC. En este sentido, es importante señalar que el reactivo utilizado en la prueba espectrofotométrica (tetracloropaladato de sodio) reacciona con todos los glucosinolatos, pero especialmente con los indol-glucosinolatos (Mawlong *et al.*, 2017), mientras que las hojas de moringa se distinguen por la presencia de bencil-glucosinolatos; los valores ligeramente menores de glucosinolatos totales reportados en la prueba colorimétrica podrían ser atribuidos a esta causa. No obstante, la diferencia del contenido de glucosinolatos totales entre la prueba espectrofotométrica y por HPLC no fue significativa, lo que podría sugerir el empleo de la técnica colorimétrica, que además es más económica y requiere menor tiempo,

como una opción viable para una estimación del contenido real de glucosinolatos en las hojas de moringa.

Se sabe que el contenido de glucosinolatos totales varía dependiendo del estado de madurez de la planta, la zona geográfica, así como el tipo de solvente y la metodología empleada para su extracción, de manera que se han reportado valores de glucosinolatos totales en hojas de moringa en el intervalo de 20-60 mg/g de muestra seca (Bennett *et al.*, 2003; Amaglo *et al.*, 2010).

Leone *et al.* (2018) cuantificaron el contenido total de glucosinolatos espectrofotométricamente, al igual que en el presente trabajo, reportando valores de 21.22 ± 3.7 mg equivalentes de sinigrina/g muestra seca, ligeramente inferiores en comparación con el contenido total de glucosinolatos reportado en la presente caracterización.

6.2. Capacidad antioxidante (ABTS y DPPH).

En el Cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante del polvo de hojas de moringa por los métodos de ABTS y DPPH.

Cuadro 7. Capacidad antioxidante de polvo de hojas de moringa.

Capacidad antioxidante PHM		
Método	% ARA ¹	TEAC ²
ABTS	95.63 ± 0.92	748.94 ± 4.05
DPPH	85.90 ± 0.74	680.61 ± 5.22

¹Capacidad antirradical reportada como el porcentaje de inhibición del radical (ABTS o DPPH).

²Capacidad antioxidante reportada como μ moles equivalentes de Trolox/g de muestra.

Los resultados son la media de seis réplicas \pm la desviación estándar; los valores son expresados en base seca.

La capacidad antioxidante fue determinada en extractos metanólicos (metanol:agua 50:50 v/v; 40 mL/g de muestra). Los valores de TEAC reportados tanto para el método de DPPH como para el método de ABTS se encontraron dentro de los valores informados anteriormente para extractos metanólicos (metanol:agua 50:50 v/v; 50 mL/g de muestra) de hojas de moringa del estado de Hidalgo en los intervalos de 658.03–737.24 y 728.68–760.79 μ moles equivalentes de Trolox/g de muestra para DPPH y para ABTS, respectivamente (Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018; Caicedo-Lopez *et al.*, 2019). Asimismo, la actividad antirradical (% ARA) de DPPH fue superior a lo informado por Nobossé *et al.* (2018) respecto a extractos metanólicos (20 mL/g de muestra) de hojas de moringa frescas provenientes de África; las discrepancias podrían ser atribuidas tanto a las diferencias de la zona geográfica como al método de secado utilizado en el presente trabajo. Para ambos métodos, ABTS y DPPH, la actividad antirradical de la muestra evaluada coincidió con el % ARA reportado por Cuellar-Nuñez *et al.* (2018) para extractos metanólicos de hojas del centro de México, quienes informaron una actividad antirradical > 80 % de DPPH y > 90 % de ABTS.

La capacidad antioxidante se atribuye al contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes caracterizados en las hojas de moringa (Cuadro 6), principalmente flavonoides como vainillina y rutina (Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018). En extractos metanólicos de hojas de moringa se ha identificado, además, la presencia de ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido o-cumárico, así como miricetina, rutina, catequina, quercetina y kaempferol, principalmente (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015; Cuellar-Nuñez *et al.*, 2018; Prabakaran *et al.*, 2018).

La capacidad antioxidante conferida por algunos compuestos bioactivos es importante en el control del estrés oxidativo, condición característica en la patología de diabetes mellitus tipo 2. De esta manera, los resultados informados sugieren que las hojas de moringa podrían retardar el desarrollo de complicaciones asociadas a la presencia elevada de especies reactivas de oxígeno (Jaiswal *et al.*, 2013).

Los diferentes valores reportados entre ambas técnicas se atribuyen a una mayor reactividad del radical ABTS al poder reaccionar con una mayor cantidad de compuestos aromáticos hidroxilados, independientemente de su potencial antioxidante; mientras que el radical DPPH, al ser más selectivo, no reacciona con flavonoides que no contienen grupos hidroxilo ni con ácidos aromáticos que sólo poseen un grupo hidroxilo (Roginsky & Lissi, 2005). Además, la estabilidad del radical DPPH es mayor a la de ABTS, lo cual también influye en los resultados de capacidad antioxidante reportados para ambas técnicas (Mareček *et al.*, 2017).

6.3. Ensayo biológico de Diabetes mellitus: *Drosophila melanogaster*.

6.3.1. Efectos del consumo de hojas de moringa sobre la sobrevivencia.

Dado que el funcionamiento de la vía de la insulina está relacionado con el correcto desarrollo desde la etapa embrionaria hasta la etapa de adulto (Dhar *et al.*, 2018), se determinó la sobrevivencia de ambas cepas (silvestres *yw* y mutantes *InR*) en los diferentes tratamientos. En los Cuadros 8 y 9 se muestra el análisis de la sobrevivencia de moscas criadas en las diferentes dietas con PHM.

En el caso de la cepa *yw*, el porcentaje de pupas incrementó hasta 12 % con las dietas suplementadas con 0.5, 1.5 y 2.5 % de PHM respecto a moscas criadas con la dieta estándar (DE); mientras que en la cepa *InR* se observó un incremento de pupas en el intervalo de 20-25 % con las concentraciones de 1.5, 2.5 y 4.0 % de PHM en comparación con las moscas *InR* tratadas con dieta DE. En contraste, el consumo de las concentraciones de 4.0 y 5.5 % de PHM provocó la reducción del total de pupas en la cepa *yw* en comparación con la sobrevivencia de las moscas *yw* alimentadas con una dieta estándar.

Por su parte, la cepa *InR* no mostró reducción significativa en el porcentaje de pupas con ninguna dieta, sin embargo, el porcentaje de pupas con la dieta de

5.5 % de PHM comenzó a disminuir en comparación con el porcentaje reportado para las dietas con 1.5, 2.5 y 4.0 % de PHM. Esta disminución de pupas pudiese ser atribuida a un efecto ya tóxico de la moringa a altas concentraciones.

Cuadro 8. Total de pupas de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Dieta	Pupas ¹	
	<i>yw</i>	<i>InR</i>
DE	67.75 ± 1.11 ^a	23.50 ± 1.71 ^a
DE + 0.5% PHM	80.33 ± 0.67 ^b	42.00 ± 3.83 ^{ab}
DE + 1.5% PHM	78.33 ± 2.60 ^b	48.00 ± 6.93 ^{ab}
DE + 2.5 % PHM	79.33 ± 2.33 ^b	48.00 ± 6.32 ^b
DE + 4.0% PHM	60.25 ± 1.65 ^c	44.80 ± 5.85 ^{ab}
DE + 5.5% PHM	60.00 ± 0.58 ^c	33.50 ± 4.77 ^{ab}

¹Porcentaje. DE: Dieta estándar; PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 4-5) (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

De manera similar, se observó un incremento del 12-14 % en el total de adultos de la cepa *yw* con las concentraciones de 0.5, 1.5 y 2.5 % de PHM en comparación del total de adultos reportados para la dieta DE; mientras que para la cepa *InR* se reportó un aumento en el total de adultos en el intervalo de 21-25 % tras consumir las dietas suplementadas con 1.5, 2.5 y 4.0 % de PHM.

Al igual que para el total de pupas, el consumo de dietas suplementadas con 4.0 y 5.5 % de PHM provocó la reducción del 8 % en el total de adultos de la cepa *yw* respecto a la dieta DE-*yw*; no se observó reducción significativa en el total de adultos para la cepa *InR* alimentada con cualquier concentración de PHM respecto a la dieta DE-*InR*. Cabe señalar que, si bien la concentración de 5.5 % de PHM no provocó el incremento ni la reducción en el total de pupas y por consecuencia en el total de adultos de la cepa *InR*, esa concentración de PHM resultó en una dosis que

afectó la sobrevivencia de la cepa *yw*, de manera que no podría sugerirse como una dieta saludable.

Cuadro 9. Total de adultos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Dieta	Adultos ¹	
	<i>yw</i>	<i>InR</i>
DE	65.25 ± 0.63 ^a	21.50 ± 0.96 ^a
DE + 0.5% PHM	77.67 ± 0.67 ^b	41.75 ± 3.71 ^{ab}
DE + 1.5% PHM	77.00 ± 2.08 ^b	46.00 ± 8.08 ^{ab}
DE + 2.5 % PHM	79.00 ± 2.08 ^b	45.25 ± 6.26 ^b
DE + 4.0% PHM	57.00 ± 2.68 ^c	42.60 ± 6.12 ^{ab}
DE + 5.5% PHM	56.67 ± 1.76 ^c	30.75 ± 4.15 ^{ab}

¹Porcentaje. DE: Dieta estándar; PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 4-5).; (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

El incremento en la sobrevivencia de moscas para ambas cepas coincidió con lo reportado por Oyeniran *et al.* (2020), quienes evaluaron la sobrevivencia de moscas silvestres *Oregon* criadas desde su etapa larvaria con una dieta convencional (harina de maíz, levadura y agar) suplementada con una dosis única de PHM; los autores reportaron la sobrevivencia más alta (70-75 %) para las moscas tratadas con PHM en comparación con las moscas que no recibieron suplementación.

Los compuestos bioactivos de las hojas de moringa pueden estar influyendo sobre la sobrevivencia de los insectos. Por ejemplo, Ecker *et al.* (2017) evaluaron el efecto del consumo de extractos ricos en ácidos fenólicos y flavonoides sobre la sobrevivencia de moscas silvestres alimentadas con dieta alta en azúcares desde su etapa larvaria. En dicho estudio, se reportó un incremento de casi 30 % en la sobrevivencia de las moscas tratadas con los extractos, atribuyendo dicho aumento

a la disminución de estrés oxidativo ocasionado por la hiperglucemia. Asimismo, bajas concentraciones de isotiocianatos, metabolitos secundarios de los glucosinolatos, activan la vía de Nrf2 e inducen la actividad de NQO1 (NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1) (Tumer *et al.*, 2015). Lo anterior podría mejorar la sobrevivencia debido a una reducción de estrés oxidativo, especialmente en moscas *InR*.

Además de los compuestos bioactivos, es posible que el mayor contenido de nutrientes en la dieta, debido a la suplementación con PHM, también influya sobre la sobrevivencia de las moscas. En este sentido, Jang & Lee (2018) reportaron un aumento en la sobrevivencia de moscas silvestres *Canton-S* alimentadas con diferentes proporciones de proteína:carbohidrato (P:C) en la dieta, sugiriendo un incremento en la sobrevivencia de moscas alimentadas con proporciones P:C de 1:2 a 1:4. Mientras que Rodrigues *et al.* (2015) y Davies *et al.* (2018) reportaron una mejoría en la viabilidad de moscas tratadas con proporciones P:C en el intervalo de 1:1 hasta 1:8. Este mismo efecto de la mejora en la sobrevivencia de moscas *InR* debido a una dieta que contenía aminoácidos ha sido reportado también por Hasan (2017). Cabe señalar que la relación P:C de la dieta estándar usada en el presente trabajo fue de 1:6, mientras que las dietas con PHM que resultaron en un incremento de la sobrevivencia presentaron una relación P:C entre 1:6 (0.5 % PHM) y 1:5 (1.5 y 2.5 % PHM). Si bien las dietas con mayor contenido de moringa (4.0 y 5.5 %) presentaron una relación P:C de 1:4, la reducción de la sobrevivencia reportada para las moscas criadas con estas dietas podría ser debido a la presencia de otros compuestos que, a altas concentraciones, resultan ser tóxicos, especialmente para moscas *yw*.

Aun cuando se ha reportado que bajas concentraciones de isotiocianatos favorecen la reducción de estrés oxidativo (Tumer *et al.*, 2015), el consumo excesivo de estos compuestos ha resultado ser tóxico para la viabilidad de algunas cepas de *D. melanogaster*. En este sentido, Lozano-Baena *et al.* (2015) reportaron una

disminución de aproximadamente 50 % en la sobrevivencia de larvas de las cepas *flare* y *mwh* suplementadas en dieta con diferentes concentraciones de hojas liofilizadas de *B. carinata*, atribuyendo dicha reducción al contenido de glucosinolatos presentes en el alimento (4.62 mg/g en peso seco). Lo anterior podría explicar la reducción de sobrevivencia para moscas silvestres tratadas con 4.0 y 5.5 % de PHM. A la fecha se desconoce el efecto directo de los glucosinolatos de hojas de moringa sobre la sobrevivencia de las moscas en estudio, de manera que estos compuestos podrían ejercer un efecto tóxico en concentraciones diferentes a las reportadas para otras *Brassicas*. Asimismo, diferentes cepas del modelo de *Drosophila melanogaster* podrían responder diferente a la toxicidad ejercida por los glucosinolatos e isotiocianatos de la dieta.

Es posible que el consumo de las concentraciones de 4.0 y 5.5 % de PHM no hayan provocado la disminución en la sobrevivencia de la cepa *InR* respecto a la dieta DE-*InR* debido a la función disminuida en el receptor de insulina de esta cepa, dando como resultado una menor respuesta al estímulo ejercido tanto por los nutrientes como por los compuestos bioactivos debido al daño neuronal en moscas *InR*, consecuencia de un fenotipo diabético (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011). No obstante, no se descarta la posibilidad de que a mayores concentraciones de PHM la sobrevivencia de las moscas *InR* se vea afectada como consecuencia del exceso de glucosinolatos en la dieta.

Para poder determinar el impacto del incremento de la sobrevivencia en la cepa *InR* suplementada con PHM, se realizó la comparación de los resultados entre la sobrevivencia de esta cepa y la sobrevivencia de su control silvestre *yw* criado en una dieta estándar. En general, se encontró una tendencia similar en la sobrevivencia huevo-adulto después de la suplementación en dieta con PHM tanto para la cepa silvestre como para la cepa mutante; sin embargo, para la cepa *InR* únicamente las concentraciones de 1.5 y 2.5 % de PHM lograron igualar los

porcentajes de pupas y adultos reportados para la sobrevivencia de la cepa *yw* alimentada con la dieta estándar (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de sobrevivencia entre cepa *yellow-white* criada con dieta estándar y la cepa *InR* criada con dieta suplementada con polvo de hojas de moringa.

Dieta	Pupas¹	Adultos¹
DE (<i>yw</i>)	67.75 ± 1.11	65.25 ± 0.63
DE + 0.5% PHM (<i>InR</i>)	42.00 ± 3.83*	41.75 ± 3.71*
DE + 1.5% PHM (<i>InR</i>)	48.00 ± 6.93	46.00 ± 8.08
DE + 2.5 % PHM (<i>InR</i>)	48.00 ± 6.32	45.25 ± 6.26
DE + 4.0% PHM (<i>InR</i>)	44.80 ± 5.85*	42.60 ± 6.12*
DE + 5.5% PHM (<i>InR</i>)	33.50 ± 4.77*	30.75 ± 4.15*

¹Porcentaje. DE: Dieta estándar; PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 4-5). Asteriscos en las columnas expresan diferencias significativas respecto al control (DE; *yw*) por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

6.3.2. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el cambio de peso.

El peso corporal es un parámetro que refleja el crecimiento dependiendo la calidad, tanto cualitativa como cuantitativa, de la dieta recibida por las moscas desde su etapa larvaria (Poças *et al.*, 2020); además, es considerado como una medida que permite evaluar los efectos de la señalización de la insulina en el crecimiento (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011). Por estas razones, se evaluó el cambio de peso de las cepas en estudio para determinar el efecto del consumo de hojas de moringa sobre el crecimiento de moscas *InR*, y, por tanto, determinar si las diferentes concentraciones de PHM pudieran llegar a ser tóxicas.

En los Cuadros 11 y 12 se muestra el análisis de los resultados del cambio de peso de machos y hembras, respectivamente. La suplementación con 0.5 % de PHM provocó la reducción de peso para machos *yw*, mientras que el consumo de 4.0 y 5. 5% de PHM ocasionó el efecto contrario, es decir, el incremento de peso en comparación con el peso de moscas macho *yw* alimentadas con una dieta estándar.

En machos *InR* el consumo de 5.5 % de PHM provocó el incremento de peso; dado que no se reportó una disminución de peso para machos *InR* con ninguna dieta suplementada con PHM, podría sugerirse la ausencia de efectos adversos sobre el crecimiento para esta cepa.

Cuadro 11. Peso total de machos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Dieta	Peso (mg)	
	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	0.81 ± 0.04 ^a	0.44 ± 0.03 ^a
DE + 0.5% PHM	0.77 ± 0.04 ^b	0.46 ± 0.03 ^b
DE + 1.5% PHM	0.80 ± 0.04 ^a	0.45 ± 0.02 ^{ab}
DE + 2.5 % PHM	0.80 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.03 ^{ab}
DE + 4.0% PHM	0.84 ± 0.05 ^c	0.44 ± 0.02 ^a
DE + 5.5% PHM	0.88 ± 0.04 ^d	0.49 ± 0.02 ^c

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n= 30). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En las moscas hembra, la suplementación con 1.5 y 2.5 % de PHM provocó la reducción de peso de la cepa *yw*, mientras que el consumo de 5.5 % de PHM ocasionó el aumento de peso en el mismo grupo de moscas.

Por su parte, en hembras *InR* se observó la ganancia de peso tras el consumo de las dietas suplementadas con 0.5, 1.5 y 2.5 % de PHM en comparación con el peso reportado para hembras *InR* alimentadas con la dieta estándar. Es importante señalar que este aumento de peso coincidió con el incremento de la sobrevivencia de esta cepa (Cuadros 8 y 9), por lo que podría sugerirse un incremento de peso adecuado que benefició el desarrollo de las hembras *InR*, el cual usualmente es reducido debido a la disminuida señalización de la insulina en esta cepa.

Cuadro 12. Peso total de hembras de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Dieta	Peso (mg)	
	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	1.55 ± 0.07 ^a	0.70 ± 0.04 ^a
DE + 0.5% PHM	1.53 ± 0.06 ^a	0.74 ± 0.02 ^b
DE + 1.5% PHM	1.40 ± 0.11 ^b	0.74 ± 0.04 ^b
DE + 2.5 % PHM	1.41 ± 0.07 ^b	0.73 ± 0.03 ^b
DE + 4.0% PHM	1.55 ± 0.13 ^a	0.69 ± 0.03 ^a
DE + 5.5% PHM	1.66 ± 0.16 ^c	0.69 ± 0.02 ^a

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n= 30). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Las diferentes respuestas entre hembras y machos, tras el consumo de PHM, podría ser debido a dimorfismos sexuales. Algunos autores han reportado diferencias entre ambos sexos para lograr el mantenimiento del metabolismo en lo que refiere a la expresión de genes (Stobdan *et al.*, 2019), el cambio de peso y la actividad locomotora (Chen *et al.*, 2019), así como en el comportamiento de alimentación, tanto en hembras como en machos *yw* e *InR* (Álvarez-Rendón & Riesgo-Escovar, 2020). Ejemplo de lo anterior fue reportado por Dong *et al.* (2019), quienes evaluaron el cambio de peso en hembras y machos de la cepa *InR^{p5545}* después de suplementar la dieta de las moscas con 5 y 10 % de inulina, reportando la disminución de peso en hembras después de 10, 20 y 30 días de tratamiento, sin cambios significativos en el peso de las moscas macho, posiblemente debido a cambios hormonales y a la producción de huevos de las moscas hembra.

Como era de esperarse, se observó una reducción de casi 50 % en el peso corporal de la cepa *InR* respecto al control *yellow-white*, debido a la disminución en la función del receptor de insulina. Otero-Moreno *et al.* (2019) evaluaron el cambio de peso de hembras *InR* y hembras *yw* de 5 días post eclosión, después de criar a

las moscas en dietas con diferentes proporciones de nutrientes, reportando menores pesos en la cepa *InR* en comparación con la cepa *yw*, independientemente del régimen alimenticio al que fueron sometidas.

Por otro lado, es posible que el aumento de peso ocasionado por el consumo de 5.5 % de PHM, tanto para la cepa *yw* como para la cepa *InR*, haya sido debido a la mayor cantidad de nutrientes en la dieta, ya que se ha informado sobre el aumento de peso en moscas silvestres *Canton-S* alimentadas con dietas altas en carbohidratos (Rovenko *et al.*, 2015). Se sabe, también, que generalmente las moscas tienden a consumir la misma cantidad de alimento, independientemente del contenido calórico de la dieta (Bross *et al.*, 2005), lo cual podría reafirmar que el aumento de peso en las moscas suplementadas con 5.5 % de PHM fue debido a la cantidad de nutrientes en la dieta y no debido a un mayor consumo de alimento. Este aumento de peso podría explicar, en parte, la reducción de sobrevivencia reportada para la cepa *yw* (Cuadros 8 y 9), posiblemente debido a la presencia de otras alteraciones bioquímicas relacionadas con un exceso de reservas ya sea de lípidos o de carbohidratos.

La reducción de peso en moscas silvestres *yw* concuerda con lo reportado por Oyeniran *et al.* (2020), quienes informaron sobre la disminución de peso en moscas silvestres *Oregon* alimentadas con dieta convencional y dieta alta en azúcares (15 y 30 % sacarosa) suplementadas con una dosis única de PHM. Si bien los autores no indicaron mecanismos a través de los cuales se dio la pérdida de peso, este efecto podría ser atribuido al contenido fenólico del PHM, ya que se ha informado sobre la disminución de peso en moscas silvestres *w¹¹¹⁸* de ambos sexos suplementadas en dieta con polifenoles de té verde (Lopez *et al.*, 2016), así como la reducción de peso de moscas *Oregon-R*, hembras y machos, alimentadas con dieta alta en azúcares y suplementadas con extractos ricos en compuestos bioactivos (Dhar *et al.*, 2018).

Además, diversos autores han sugerido cambios en el peso de roedores suplementados con extractos acuosos y etanólicos de hojas de moringa. Divi *et al.* (2012), por ejemplo, reportaron la prevención en la ganancia de peso de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en fructosa y suplementadas durante 60 días con extracto acuoso de hojas de moringa, atribuyendo la regulación de peso a una disminución en los niveles de triglicéridos. Por su parte, Waterman *et al.* (2015) reportaron la disminución de peso en ratones macho de la cepa C57BL/6, alimentados con dieta alta en grasa, después de 12 semanas de suplementación con extracto rico en isotiocianatos, sugiriendo la disminución de peso como resultado de la reducción de lípidos en el hígado, así como la disminución de los niveles de insulina, leptina y resistina en plasma. Mientras tanto, Metwally *et al.* (2017) informaron sobre la prevención de ganancia de peso en ratas Wistar hembra alimentadas con dieta alta en grasa y suplementadas durante 12 semanas con extracto etanólico de hojas de moringa, atribuyendo este efecto a la disminución en la expresión de hormonas producidas por el tejido adiposo, entre ellas la leptina y la resistina, así como al incremento de expresión de la hormona adiponectina.

Como se indicó anteriormente, en el presente trabajo únicamente se reportó la reducción de peso para moscas de la cepa *yw*, de manera que las inconsistencias en comparación con los resultados reportados por otros autores respecto a modelos diabéticos podrían ser atribuidas a: diferencias entre los modelos animales (mamíferos e invertebrados, hembras y machos), el desarrollo de la patología (inducida o desarrollo por mutación), así como a la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los compuestos. Además, es de notar que, en algunos de los estudios citados, se utilizaron extractos enriquecidos en compuestos bioactivos, mientras que en el presente trabajo se utilizó una matriz completa, de manera que el contenido de otros nutrientes presentes en las hojas de moringa puede estar interfiriendo con el efecto ejercido por los compuestos implicados en la regulación del peso corporal.

6.3.3. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el contenido de carbohidratos totales.

Se ha reportado que moscas *InRE^{19/3T5}* presentan altos niveles de carbohidratos totales respecto a su peso desde su primer día post eclosión, a diferencia de las moscas *yellow-white*, y que dicha condición perdura, al menos, hasta los 30 días post eclosión (Otero-Moreno *et al.*, 2019; Álvarez-Rendón, 2019). Por este motivo, se evaluó el efecto del consumo de hojas de moringa sobre el contenido total de carbohidratos en las moscas en estudio.

En los Cuadros 13 y 14 se muestran los resultados de carbohidratos totales de machos y hembras de 4-5 días post eclosión alimentados con las diferentes dietas.

El contenido de carbohidratos totales disminuyó en machos *yw* tras el consumo de 0.5-2.5 % de PHM, observándose una disminución de casi 25 % en este parámetro con la suplementación de 2.5 % de PHM respecto a los carbohidratos totales reportados para moscas criadas con la dieta estándar. Asimismo, en este grupo de moscas, el consumo de 4.0 y 5.5 % de PHM ocasionó una tendencia al aumento de los niveles de carbohidratos. Lo anterior sugiere que, al menos en las moscas macho *yw*, el consumo de PHM a bajas concentraciones es favorable para el control de peso, el aumento de la sobrevivencia y la regulación en el contenido de carbohidratos totales.

El incremento de peso (Cuadro 11) y el incremento en los niveles de carbohidratos totales para machos de la cepa *yw* alimentados con 5.5 % de PHM, podría explicar, en parte, la reducción de la sobrevivencia que se presentó para esta cepa bajo dicha suplementación con PHM (Cuadros 8 y 9). Este incremento de carbohidratos totales podría estar indicando un aumento de trehalosa en la

hemolinfa de las moscas, resultado de un mayor estado de estrés oxidativo (Reyes-Dela Torre *et al.*, 2012).

En machos *InR*, al igual que en machos *yw*, la suplementación con 5.5 % de PHM provocó el aumento en los niveles de carbohidratos totales en comparación con los carbohidratos totales de machos *InR* criados con la dieta estándar.

Cuadro 13. Contenido de carbohidratos totales de machos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Carbohidratos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	66.20 \pm 1.92 ^a	94.93 \pm 4.43 ^{ab}
DE + 0.5% PHM	50.96 \pm 1.90 ^b	81.96 \pm 6.04 ^b
DE + 1.5% PHM	52.10 \pm 2.17 ^b	80.51 \pm 5.93 ^b
DE + 2.5 % PHM	49.83 \pm 2.72 ^b	102.00 \pm 4.78 ^{ab}
DE + 4.0% PHM	75.43 \pm 2.78 ^a	115.63 \pm 5.38 ^{ac}
DE + 5.5% PHM	76.89 \pm 4.84 ^a	137.84 \pm 8.08 ^c

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media ($n= 10$). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p<0.05$).

En hembras *yw*, únicamente la suplementación con 0.5 % de PHM provocó la reducción en los niveles de carbohidratos totales. Mientras tanto, en hembras *InR* no se presentaron cambios significativos en los niveles de carbohidratos totales de las moscas tratadas con cualquier dieta de PHM.

Cuadro 14. Contenido de carbohidratos totales de hembras de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Carbohidratos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	44.48 \pm 1.54 ^a	118.48 \pm 5.45 ^a
DE + 0.5% PHM	31.83 \pm 2.26 ^b	106.10 \pm 5.08 ^a
DE + 1.5% PHM	42.35 \pm 1.55 ^a	111.20 \pm 4.54 ^a
DE + 2.5 % PHM	45.10 \pm 1.33 ^a	108.57 \pm 4.97 ^a
DE + 4.0% PHM	40.23 \pm 1.18 ^a	114.76 \pm 7.97 ^a
DE + 5.5% PHM	42.80 \pm 3.15 ^a	129.90 \pm 6.86 ^a

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (n= 10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

A la fecha se desconocen estudios que hayan evaluado los niveles de carbohidratos totales (o en su defecto, todos los carbohidratos mayoritarios) en invertebrados alimentados con *Brassicas*, o con extractos de plantas ricos en compuestos bioactivos similares a la moringa. Tampoco existen reportes sobre niveles de carbohidratos (glucosa y glucógeno) en mamíferos insulinoresistentes o con diabetes tipo 2, aun siendo inducida, suplementados en dieta con PHM. Por lo que el presente trabajo sería el primero en reportar resultados de esta índole; después de varios días de suplementación, los niveles de carbohidratos totales reflejan una parte del estado energético.

Es posible que la reducción de carbohidratos totales para hembras y machos *InR*, alimentados con bajas concentraciones de PHM, no haya sido significativa debido al tiempo que fueron criadas las moscas en las diferentes dietas (4-5 días post eclosión), así como a alteraciones en el comportamiento alimenticio, en comparación con la cepa *yw*. Respecto a lo anterior, se ha informado sobre la presencia de alteraciones circadianas, consecuencia de un estado de diabetes, en las moscas *InR*; dichas alteraciones podrían repercutir en la regulación de la ingesta

calórica y el gasto energético de las moscas, provocando que la cepa *InR* consuma menor cantidad de alimento en comparación con sus controles *yw* (Álvarez-Rendón & Riesgo-Escovar, 2020). No obstante, con los resultados obtenidos, no es posible asegurar que una suplementación con PHM durante más tiempo pudiera favorecer la reducción de carbohidratos totales en moscas *InR* de la misma forma en que se reportó para su control silvestre *yw*.

La comparación de los niveles de carbohidratos totales entre la cepa *InR* alimentada con diferentes dietas suplementadas con PHM y la cepa *yw* alimentada con dieta estándar se muestra en el Cuadro 15. Se observó que machos *InR* suplementados con 0.5 y 1.5 % de PHM presentaron niveles de carbohidratos totales similares a su control silvestre (machos *yw*) alimentado con dieta estándar. Sin embargo, es importante señalar que la proporción de carbohidratos totales respecto al peso corporal de la mosca no fue la misma, ya que para machos *yw* alimentados con dieta estándar los carbohidratos totales representaron el 7-8 % de su peso corporal (Cuadros 10 y 12), mientras que para machos *InR* suplementados con 0.5 y 1.5 % de PHM los carbohidratos totales representaron el 17-18 % de su peso (Cuadros 10 y 12). Esto sugiere que el consumo de PHM, a bajas concentraciones, provoca una mejoría importante respecto al contenido de carbohidratos totales en machos *InR*, sin embargo, no logra igualar el fenotipo sano de la cepa *yw*.

En el caso de las moscas hembra, por el contrario, ninguna suplementación con PHM logró disminuir los niveles de carbohidratos totales de las hembras *InR*. Nuevamente, las diferentes respuestas entre hembras y machos pudieron ser debidas a factores dependientes del sexo, como se ha mencionado anteriormente.

Cuadro 15. Comparación de carbohidratos totales entre cepa mutante *InR* suplementada con polvo de hojas de moringa y cepa silvestre *yellow-white* alimentada con dieta estándar.

Dieta	Carbohidratos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)	
	Machos	Hembras
DE (<i>yw</i>)	66.20 \pm 1.92	44.48 \pm 1.54
DE + 0.5% PHM (<i>InR</i>)	81.96 \pm 6.04	106.10 \pm 5.08*
DE + 1.5% PHM (<i>InR</i>)	80.51 \pm 5.93	111.20 \pm 4.54*
DE + 2.5 % PHM (<i>InR</i>)	102.00 \pm 4.78*	108.57 \pm 4.97*
DE + 4.0% PHM (<i>InR</i>)	115.63 \pm 5.38*	114.76 \pm 7.97*
DE + 5.5% PHM (<i>InR</i>)	137.84 \pm 8.08*	129.90 \pm 6.86*

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media ($n= 10$). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión. Asteriscos en las columnas expresan diferencias significativas respecto al control (DE; *yw*) por la prueba de Dunnett ($p<0.05$).

6.3.4. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre los niveles de glucosa total.

Los niveles de glucosa en las moscas pueden verse afectados tanto por la dieta, como por el estado nutricional del insecto. Se ha informado sobre la expresión de enzimas gluconeogénicas en moscas alimentadas con dieta alta en azúcares, debido a un estado de insulinoresistencia inducida, dando como resultado el incremento en los niveles de glucosa (Musselman *et al.*, 2011). Asimismo, tanto la inhibición de enzimas intestinales como la regulación de PGC-1 α , se han asociado con la disminución de glucosa en algunas cepas de *Drosophila melanogaster* (Rera *et al.*, 2011; Baenas *et al.*, 2016). En los Cuadros 16 y 17 se muestran los resultados de los niveles de glucosa total en machos y hembras de ambas cepas (*yw* e *InR*) alimentados con las diferentes concentraciones de PHM.

La suplementación con 0.5 % de PHM ocasionó la reducción en los niveles de glucosa total de machos *yw* en comparación con los niveles de glucosa de machos *yw* alimentados con una dieta estándar; esto coincide con la disminución

de peso y de carbohidratos totales reportados para el mismo grupo de moscas alimentadas con la misma dieta (Cuadros 11 y 13). También se presentó un efecto hipoglucemiante en machos *yw* criados con 5.5 % de PHM, resultado que coincidió con la disminución en la sobrevivencia de moscas silvestres suplementadas con la misma cantidad de PHM (Cuadros 8 y 9), lo cual podría sugerir una hipoglucemia que repercute en el estado de salud del insecto.

En machos *InR*, a diferencia de machos *yw*, no se presentaron cambios en los niveles de glucosa total después de la suplementación con cualquier concentración de PHM.

Cuadro 16. Niveles de glucosa total de machos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Dieta	Glucosa (µg/mg de peso)	
	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	22.63 ± 1.90 ^a	29.92 ± 2.39 ^a
DE + 0.5% PHM	13.08 ± 1.31 ^b	29.88 ± 2.38 ^a
DE + 1.5% PHM	20.68 ± 1.26 ^a	26.80 ± 2.03 ^a
DE + 2.5 % PHM	19.81 ± 1.29 ^{ac}	32.47 ± 1.11 ^a
DE + 4.0% PHM	22.80 ± 1.47 ^a	33.09 ± 2.79 ^a
DE + 5.5% PHM	14.78 ± 1.31 ^{bc}	29.60 ± 1.15 ^a

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 8-10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Al igual que los machos *yw*, en hembras *yw* se reportó la disminución de glucosa total tras la suplementación con 0.5 % de PHM respecto a las moscas alimentadas con dieta estándar, en concordancia con la disminución de carbohidratos totales para el mismo grupo de moscas alimentadas con la misma dieta (Cuadro 13). Por el contrario, el consumo de 4.0 % de PHM ocasionó el incremento en los niveles totales de glucosa, posiblemente debido a una mayor cantidad de nutrientes.

Al igual que en machos *yw*, las moscas hembra *yw* suplementadas con 5.5 % de PHM presentaron reducción en sus niveles de glucosa. Nuevamente, debido a la reducción de la sobrevivencia bajo este régimen alimenticio (Cuadros 8 y 9), la hipoglucemia por la suplementación con 5.5 % PHM sugiere efectos adversos en el estado nutricional de las moscas hembra *yw*. En hembras *InR*, no se presentaron diferencias entre tratamientos con moringa, sin embargo, la suplementación con 1.5 % de PHM provocó una reducción > 20 % en los niveles de glucosa total respecto a las hembras *InR* tratadas con una dieta estándar.

Cuadro 17. Niveles de glucosa total de hembras de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Glucosa (µg/mg de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	12.64 ± 1.00 ^{ab}	26.93 ± 1.71 ^a
DE + 0.5% PHM	9.16 ± 0.82 ^{bc}	23.57 ± 2.51 ^a
DE + 1.5% PHM	14.69 ± 0.86 ^a	20.76 ± 0.91 ^a
DE + 2.5 % PHM	14.53 ± 0.70 ^a	22.87 ± 2.01 ^a
DE + 4.0% PHM	15.98 ± 0.74 ^a	25.11 ± 0.78 ^a
DE + 5.5% PHM	8.98 ± 0.74 ^c	23.89 ± 0.71 ^a

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 8-10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La reducción en los niveles de glucosa para machos y hembras *yw* suplementados con bajas concentraciones de PHM concuerda con lo reportado por Baenas *et al.* (2016), quienes informaron la reducción de aproximadamente 20 % en el total de glucosa de moscas silvestres *w¹¹¹⁸* suplementadas durante 10 días con polvo de brotes de rábano rojo (~10 mg/mL), atribuyendo este efecto a la inhibición de las enzimas intestinales α -glucosidasa y α -amilasa, así como al incremento en los niveles de ARNm de *spargel*, el gen homólogo de PPAR γ coactivador-1 (PGC-1 α). Se sabe que PGC-1 α tiene un papel en el mantenimiento mitocondrial y en la homeostasis de la glucosa al promover enzimas implicadas en

la gluconeogénesis y al mejorar la resistencia a la insulina (Besse-Patin *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que *spargel* potencia el mantenimiento y la actividad mitocondrial, así como la homeostasis energética y la esperanza de vida de la mosca (Rera *et al.*, 2011).

Es posible que en el presente trabajo se haya observado un efecto hipoglucemiante con bajas cantidades de PHM (0.5 %) debido a la concentración de glucosinolatos en las hojas de moringa (29.49 mg/g muestra seca), así como a la estabilidad de estos compuestos. A diferencia de los glucosinolatos de otras *Brassicas*, se ha reportado que los glucosinolatos presentes en las hojas de moringa contienen un azúcar adicional en su estructura molecular: la ramnosa. Esta ramnosa provee de estabilidad y apariencia sólida a los glucosinolatos e isotiocianatos presentes en las hojas de moringa, incluso a temperatura ambiente (Tumer *et al.*, 2015).

Además de los glucosinolatos, el contenido de taninos condensados presentes en las hojas de moringa podría influir en el efecto hipoglucemiante reportado para las cepas en estudio. En un estudio realizado por Wagner *et al.* (2015), moscas macho de la cepa silvestre *w¹¹¹⁸* fueron alimentadas con una dieta convencional suplementada con extracto de té verde rico en epigallocatequina-3-galato; si bien no se determinó la cantidad de alimento ingerido por las moscas, los autores informaron cambios en algunos parámetros después de 10 días de suplementación. En dicho estudio, se reportó una disminución en los niveles de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa debido a una inhibición competitiva entre la epigallocatequina-3-galato y el sustrato. Asimismo, se reportó una reducción del 25 % en los niveles de glucosa total en las moscas suplementadas con el extracto como consecuencia de la inhibición del proceso de gluconeogénesis; los autores atribuyeron este último efecto a un incremento en los niveles de AMPK y la subsecuente inhibición de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Wagner *et al.*, 2015).

Recientemente, Oyeniran *et al.* (2020) reportaron la prevención de hiperglucemia en moscas silvestres *Oregon* (sexo no especificado) alimentadas con dieta alta en azúcares (15 y 30 % de sacarosa) y suplementada con una dosis única de PHM. Si bien los autores no informaron sobre mecanismos a través de los cuales se presentó la prevención de un estado diabético, se sugirió la capacidad inhibitoria de las *Brassicas* sobre la actividad de la enzima epóxido hidrolasa soluble, debido a que esta enzima está implicada en procesos de inflamación y en el desarrollo de complicaciones por diabetes (Kitamura *et al.*, 2017; Minaz *et al.*, 2018).

Con respecto a modelos diabéticos, algunos autores han informado sobre la disminución de glucosa en roedores insulinoresistentes suplementados durante varios días con extractos acuosos (Divi *et al.*, 2012; Yassa & Tohamy, 2014) y etanólicos (Metwally *et al.*, 2017; Attakpa *et al.*, 2017) de hojas de moringa ricos en compuestos fenólicos o en isotiocianatos (Waterman *et al.*, 2015). Las inconsistencias respecto a los resultados del presente trabajo, en lo referente a la cepa *InR*, podrían atribuirse a las diferencias entre los modelos animales (vertebrados e invertebrados; diabetes inducida y diabetes desarrollada por mutación), así como al uso de hojas enteras y a la presencia de otros compuestos y nutrientes que no siempre están presentes en los extractos. Además, cabe señalar que la forma habitual de consumir hojas de moringa por parte de la población es en forma de polvo o en tabletas, mas no en forma de extractos.

Hasta donde se tiene conocimiento, los estudios que han reportado la disminución de glucosa en ayuno o posprandial en pacientes con diabetes tipo 2 (tratados con hipoglucemiantes orales) sólo han evaluado el efecto de una dosis única de hojas de moringa, ya sea en polvo o en tabletas (Kumari, 2010; Ghiridhari *et al.*, 2011; Leone *et al.*, 2018). Los hallazgos reportados en el presente trabajo resultan de interés dado que no existen informes sobre el efecto del consumo de diferentes cantidades de PHM en modelos animales o pacientes con diabetes tipo 2 sin tratamiento farmacológico.

6.3.5. Efectos del consumo de hojas de moringa sobre los niveles de glucógeno total.

En la diabetes tipo 2 existe un desequilibrio en el balance de energía debido, en parte, a un desajuste en las reservas energéticas, entre ellas los niveles de glucógeno (Ruaud *et al.*, 2011). Las moscas adultas presentan reservas de glucógeno tanto en el músculo como en el cuerpo graso, principalmente, de manera que los niveles de glucógeno total reflejan las reservas de energéticas contenidas en ambos tejidos (Yamada *et al.*, 2018). Los resultados de los niveles de glucógeno total de las cepas *yw* e *InR* se muestran en los Cuadros 18 y 19.

En machos *yw* los niveles de glucógeno incrementaron tras la suplementación con 4.0 % de PHM en comparación con los niveles de glucógeno reportados para machos *yw* criados con dieta estándar. En contraste, en machos *InR* la suplementación con 5.5 % de PHM provocó la disminución en los niveles de glucógeno en comparación con los niveles de glucógeno de machos *InR* criados con dieta estándar.

Cuadro 18. Niveles de glucógeno total de machos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Glucógeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	6.06 \pm 0.70 ^a	14.12 \pm 1.76 ^{ab}
DE + 0.5% PHM	6.21 \pm 0.89 ^{ab}	17.40 \pm 1.98 ^{ab}
DE + 1.5% PHM	7.41 \pm 1.03 ^{ab}	17.72 \pm 2.60 ^b
DE + 2.5 % PHM	8.14 \pm 0.79 ^{ab}	11.29 \pm 0.78 ^{ac}
DE + 4.0% PHM	9.57 \pm 1.09 ^b	13.91 \pm 0.41 ^{ab}
DE + 5.5% PHM	4.70 \pm 0.49 ^a	7.24 \pm 0.86 ^c

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (n= 8-10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En las hembras *yw*, a diferencia de los machos *yw*, no se presentó el incremento en los niveles de glucógeno con ninguna suplementación de PHM. En contraste, en hembras *InR* los niveles de glucógeno fueron disminuyendo conforme incrementó la cantidad de PHM en la dieta, de manera que suplementaciones con 2.5, 4.0 y 5.5 % PHM provocaron la reducción de los niveles de glucógeno para este grupo de moscas respecto a los niveles de glucógeno reportados para hembras *InR* criadas con una dieta estándar.

Cuadro 19. Niveles de glucógeno total de hembras de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Glucógeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	2.74 ± 0.35^a	16.44 ± 1.81^a
DE + 0.5% PHM	3.76 ± 0.36^a	14.38 ± 1.27^{ab}
DE + 1.5% PHM	3.50 ± 0.54^a	12.88 ± 1.29^{ab}
DE + 2.5 % PHM	4.17 ± 0.57^a	9.17 ± 1.09^{bc}
DE + 4.0% PHM	4.46 ± 0.50^a	10.21 ± 1.36^b
DE + 5.5% PHM	2.64 ± 0.42^a	5.32 ± 0.46^c

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media ($n=8-10$). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p<0.05$).

El aumento en las reservas de glucógeno para las moscas macho *yw* podría sugerir un aumento en los niveles de algunos DILPs (péptidos parecidos a la insulina), ya que se ha demostrado que tanto DILP2 como DILP5 favorecen la formación de reservas de glucógeno en moscas silvestres *w¹¹¹⁸* (Semaniuk *et al.*, 2018). En este sentido, utilizando islotes de langerhans aislados de páncreas de ratones de la cepa BALB/c, se informó sobre la capacidad secretora de insulina que ejercen algunos compuestos presentes en el árbol de moringa, entre ellos la vainillina (Hafizur *et al.*, 2018).

Dado que se ha reportado la reducción de glucógeno en moscas de ambos sexos cuando son sometidas a estados de inanición (Schwasinger-Schmidt *et al.*, 2012), es posible que la reducción de glucógeno en machos *InR* alimentados con 5.5 % de PHM haya sido debido a un menor consumo de alimento. No obstante, es importante señalar que esta disminución de glucógeno coincidió con el incremento de peso (Cuadro 11) y el aumento de carbohidratos totales (Cuadro 13) reportados tras la ingesta de la misma dieta, por lo que es posible que las reservas energéticas en la mosca se estén sintetizando en forma de trehalosa, o bien, que las reservas de glucógeno se estén usando para sintetizar más trehalosa, resultando en este incremento de peso de y carbohidratos totales (Reyes-Dela *et al.*, 2012).

Aún cuando se presentó la disminución de glucógeno en hembras *InR* con las dietas con 2.5-4.0 % de PHM, el peso (Cuadro 12), los niveles de carbohidratos totales (Cuadro 14) y los niveles de glucosa (Cuadro 17), no se vieron afectados tras la suplementación con 2.5-4.0 % de PHM, de manera que es posible que estas moscas estén consumiendo menor cantidad de alimento sin presentar repercusiones en su estado energético. Lo anterior podría sugerir una regulación sobre *unpaired2* (homólogo de la leptina en mamíferos), resultando en cambios sobre la saciedad, dado que se ha informado que extractos alcohólicos de hojas de moringa reducen la expresión y los niveles séricos de la hormona leptina en ratas con obesidad (Ahmed *et al.*, 2014; Metwally *et al.*, 2017).

6.3.6. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre el contenido de lípidos totales.

En las moscas, los lípidos se almacenan principalmente en el cuerpo graso, sin embargo, también pueden encontrarse depósitos de lípidos en el intestino y en la cutícula (Tennessee *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la señalización disminuida de la insulina, así como la ausencia de nutrientes y un estado de estrés oxidativo, provocan la traslocación de dFOXO hacia el núcleo, favoreciendo la activación de genes diana, entre ellos 4E-BP (Toshniwal *et al.*, 2019). El incremento en los niveles de 4E-BP se ha visto asociado con el metabolismo lipídico y la acumulación de grasa en el modelo de *Drosophila melanogaster*, especialmente en condiciones de estrés (Teleman *et al.*, 2005).

Por lo anterior, los lípidos suelen acumularse de manera anormal en moscas con un fenotipo de diabetes tipo 2 (moscas *InR*), debido a la disminución en la función del receptor de insulina y a la presencia de especies reactivas de oxígeno, presentándose incrementos de hasta 30 % en el contenido de lípidos para hembras de la cepa *InR^{E19/3T5}* respecto a hembras silvestres *yw* (Murillo-Maldonado *et al.*, 2011; Otero-Moreno *et al.*, 2019). Por este motivo, se determinó el efecto de los diferentes tratamientos con PHM sobre la acumulación de lípidos totales en las moscas en estudio.

En los Cuadros 20 y 21 se muestran las concentraciones de lípidos totales para machos y hembras, respectivamente. En moscas macho *yw* la dieta con 5.5 % de PHM provocó la reducción de lípidos totales respecto a la dieta estándar y a las dietas con bajas cantidades de PHM. Cabe señalar que dicha reducción coincidió con la disminución de sobrevivencia (Cuadros 8 y 9) y con el efecto hipoglucemiante (Cuadro 16) reportado para esta cepa.

Por su parte, los niveles de lípidos en moscas *InR* disminuyeron tras el consumo de 0.5-2.5 % de PHM, lo cual favoreció la sobrevivencia para estas moscas (Cuadros 8 y 9). En ninguna cepa se presentó incremento de lípidos totales después de la suplementación con cualquier dieta de PHM.

Cuadro 20. Concentración de lípidos totales de machos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Lípidos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	85.07 \pm 1.76 ^a	106.71 \pm 5.63 ^a
DE + 0.5% PHM	83.54 \pm 2.24 ^a	87.74 \pm 3.31 ^b
DE + 1.5% PHM	83.94 \pm 1.97 ^a	91.06 \pm 3.36 ^b
DE + 2.5 % PHM	77.32 \pm 1.22 ^{ab}	91.42 \pm 2.21 ^b
DE + 4.0% PHM	76.58 \pm 2.13 ^{ab}	101.92 \pm 2.46 ^{ab}
DE + 5.5% PHM	72.80 \pm 3.12 ^b	102.51 \pm 2.60 ^{ab}

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (n= 9-10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

En hembras de la cepa *yw*, se reportó la reducción de lípidos totales con dietas de ≥ 1.5 % de PHM. Es importante señalar que, en este mismo grupo de moscas, la reducción de lípidos totales tras la ingesta de 4.0 y 5.5 % de PHM coincidió con la disminución de la sobrevivencia (Cuadros 8 y 9) y la presencia de alteraciones en los niveles de glucosa (Cuadro 17).

Por su parte, la ingesta de 0.5-2.5 % de PHM provocó la disminución de lípidos totales para hembras *InR*, lo cual coincidió con la mejora en la sobrevivencia (Cuadros 8 y 9) y con la ganancia adecuada de peso (Cuadro 12) reportada para este grupo de moscas. Lo anterior podría sugerir que hembras *InR*, criadas con 0.5, 1.5 y 2.5 % de PHM, presentan un fenotipo de mayor tamaño y mayor robustez en comparación con hembras *InR* criadas con una dieta estándar, lo cual favorece, además, su sobrevivencia.

Cuadro 21. Concentración de lípidos totales de hembras de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Lípidos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	61.34 \pm 1.51 ^a	92.37 \pm 3.10 ^a
DE + 0.5% PHM	54.67 \pm 2.06 ^{ab}	70.12 \pm 2.90 ^b
DE + 1.5% PHM	49.86 \pm 1.75 ^{bc}	79.57 \pm 2.80 ^{bc}
DE + 2.5 % PHM	49.40 \pm 2.39 ^{bc}	78.05 \pm 4.15 ^{bc}
DE + 4.0% PHM	42.79 \pm 2.04 ^c	88.95 \pm 2.18 ^{ac}
DE + 5.5% PHM	44.06 \pm 1.95 ^c	87.43 \pm 2.20 ^{ac}

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (n= 10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La disminución de lípidos, glucosa y supervivencia reportada para moscas *yw* de ambos sexos, tras la suplementación con ≥ 4.0 % de PHM, indica la presencia de alteraciones en el metabolismo que repercuten en la calidad de vida de la cepa *yw*. Por otra parte, la disminución de los niveles de lípidos que se presentó en hembras *yw* podría explicar la pérdida de peso informada para estas moscas tras la suplementación con 1.5 y 2.5 % de PHM (Cuadro 12). Todos estos resultados apuntan el uso del modelo de *Drosophila melanogaster* como un sistema biológico óptimo para el desarrollo de estudios relacionados con la ingesta y su efecto sobre el metabolismo y la supervivencia.

Algunos estudios con machos vertebrados han reportado la reducción de lípidos después de la suplementación con extractos acuosos (Divi *et al.*, 2012) y metanólicos (Olayaki *et al.*, 2015) de hojas moringa ricos en compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. Asimismo, Waterman *et al.* (2015) reportaron la disminución del contenido total de lípidos en hígados de ratones macho de la cepa C57BL/6J suplementados con un extracto rico en isotiocianatos provenientes de las hojas de moringa.

La reducción de lípidos que se presentó tanto para la cepa *yw* como para la cepa *InR*, podría ser atribuida ya sea a una reducción de la adipogénesis o a un incremento de la lipólisis (Zhang *et al.*, 2020). En este sentido, se ha informado que las hojas de moringa previenen, en vertebrados, la diferenciación de las células madre hacia adipocitos debido a la expresión disminuida de genes implicados en la adipogénesis, como SREBP-1c y FAS (ácido graso sintasa), resultando en la disminución intracelular de lípidos (Barbagallo *et al.*, 2016). Asimismo, Balusamy *et al.* (2019) informaron sobre la disminución de adipogénesis y el aumento de apoptosis, de manera dosis-dependiente, en células 3T3-L1 tratadas con extracto etanólico de hojas de moringa (100–2000 µg/mL), atribuyendo dichos efectos a la interacción de los flavonoides presentes en las hojas, principalmente isoquercetina, con proteínas implicadas en el proceso de adipogénesis, como PPAR γ .

Aun cuando en el presente trabajo se utilizaron hojas enteras, la reducción de lípidos que se presentó en hembras y machos de ambas cepas fue significativa, en concordancia con lo que otros autores han reportado para extractos de hojas de moringa en otros modelos animales que requieren tiempos de estudio más largos y que, además, son más caros. Lo anterior sugiere al modelo de *Drosophila melanogaster* como un sistema óptimo para la realización de investigaciones relacionadas con el metabolismo lipídico.

Al comparar los niveles de lípidos totales de la cepa *InR*, suplementada con las dietas de PHM, y la cepa control *yw* criada con dieta estándar (Cuadro 22), se encontró que la suplementación con 0.5-2.5 % de PHM redujo la acumulación de lípidos en machos *InR* al grado de semejar el contenido de lípidos totales de su control *yw* tratado con una dieta estándar. Mientras que, en las hembras *InR*, únicamente la dieta con 0.5 % de PHM igualó estadísticamente los niveles de lípidos de su control sano (hembras *yw*) criado con la dieta estándar.

Respecto a lo anterior, es importante considerar que el contenido total de lípidos para machos *yw* criados con una dieta estándar representó aproximadamente el 10 % de su peso total, mientras en machos *InR* tratados con 0.5-2.5 % de PHM los lípidos totales constituyeron aproximadamente el 20 % de su peso corporal (Cuadro 11). De manera similar, en hembras *yw* alimentadas con dieta estándar, los lípidos totales representaron el 4-5 % de su peso, mientras que en las hembras *InR* criadas con 0.5 % de PHM los lípidos totales constituyeron el 9-10 % de su peso corporal (Cuadro 12). Por lo anterior, podría sugerirse que, si bien existe mejoría en la acumulación de lípidos para moscas *InR* tratadas con PHM, esta mejoría no llega a igualar el contenido normal de lípidos que se presenta en su control sano, la cepa *yw*.

Cuadro 22. Comparación de lípidos totales entre cepa mutante *InR* suplementada con polvo de hojas de moringa y cepa silvestre *yellow-white* alimentada con dieta estándar.

Dieta	Lípidos totales (µg/mg de peso)	
	Machos	Hembras
DE (<i>yw</i>)	85.07 ± 1.76	61.34 ± 1.51
DE + 0.5% PHM (<i>InR</i>)	87.74 ± 3.31	70.12 ± 2.90
DE + 1.5% PHM (<i>InR</i>)	91.06 ± 3.36	79.57 ± 2.80*
DE + 2.5 % PHM (<i>InR</i>)	91.42 ± 2.21	78.05 ± 4.15*
DE + 4.0% PHM (<i>InR</i>)	101.92 ± 2.46*	88.95 ± 2.18*
DE + 5.5% PHM (<i>InR</i>)	102.51 ± 2.60*	87.43 ± 2.20*

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión. Asteriscos en las columnas expresan diferencias significativas respecto al control (DE; *yw*) por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$).

6.3.7. Efecto del consumo de hojas de moringa sobre los niveles de triglicéridos.

Además de las reservas de glucógeno, las reservas energéticas de triglicéridos suelen verse afectadas cuando las moscas son sometidas a estados de estrés, como inanición o cambios en la alimentación (Schwasinger-Schmidt *et al.*,

2012). En los Cuadros 23 y 24 se muestran los niveles de triglicéridos para machos y hembras, respectivamente, criados con las diferentes dietas con PHM.

La suplementación con PHM ocasionó un incremento dosis-dependiente en los niveles de triglicéridos para machos *yw*, especialmente con las dietas de 4.0 y 5.5 % de PHM. Este efecto coincidió, además, con la reducción de la sobrevivencia (Cuadros 8 y 9) y con el aumento de peso (Cuadro 11) reportado en este grupo de moscas criadas con las mismas dietas, lo que sugiere que las altas cantidades de PHM en la dieta alteran la calidad de vida de machos *yw*. En contraste, machos *InR* presentaron una reducción dosis-dependiente en las reservas de triglicéridos, especialmente con las suplementaciones de 4.0 y 5.5 % de PHM.

Cuadro 23. Niveles de triglicéridos totales de machos de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentados con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes cantidades de polvo de hojas de moringa.

Triglicéridos (µg/mg de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	10.79 ± 1.08 ^a	26.75 ± 1.45 ^a
DE + 0.5% PHM	11.27 ± 1.16 ^{ab}	24.41 ± 1.90 ^{ab}
DE + 1.5% PHM	11.44 ± 1.24 ^{ab}	21.08 ± 1.44 ^{ab}
DE + 2.5 % PHM	13.91 ± 0.95 ^{ab}	21.65 ± 0.84 ^{ab}
DE + 4.0% PHM	15.51 ± 1.42 ^{bc}	20.59 ± 1.00 ^b
DE + 5.5% PHM	19.07 ± 0.42 ^c	20.79 ± 1.44 ^b

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Respecto a los niveles de triglicéridos para las moscas hembra, similar a los machos *yw*, en hembras *yw* este parámetro incrementó con las suplementaciones más altas de PHM (4.0 y 5.5 %). Mientras tanto, los niveles de triglicéridos para hembras *InR* fueron aumentando conforme incrementaba la cantidad de PHM en la dieta, de manera que la dieta con 5.5 % de PHM resultó en un aumento significativo

de los niveles de triglicéridos para este grupo de moscas respecto a los triglicéridos reportados para hembras *InR* criadas con dieta estándar.

Cuadro 24. Niveles de triglicéridos totales de hembras de cepa silvestre (*yw*) y cepa mutante (*InR*) alimentadas con dieta estándar y dieta suplementada con diferentes dosis de polvo de hojas de moringa.

Triglicéridos (µg/mg de peso)		
Dieta	Cepa <i>yw</i>	Cepa <i>InR</i>
DE	16.88 ± 1.24 ^a	25.50 ± 1.11 ^a
DE + 0.5% PHM	14.54 ± 1.17 ^{ab}	25.11 ± 1.11 ^{ab}
DE + 1.5% PHM	15.09 ± 0.90 ^{ab}	26.64 ± 0.91 ^{ab}
DE + 2.5 % PHM	20.95 ± 0.81 ^{ac}	26.45 ± 0.75 ^{ab}
DE + 4.0% PHM	23.38 ± 1.56 ^c	26.92 ± 0.79 ^{ab}
DE + 5.5% PHM	24.82 ± 1.20 ^c	29.15 ± 1.11 ^b

DE: Dieta estándar. PHM: Polvo de hojas de moringa. Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media (n= 10). Moscas vírgenes de 4-5 días post eclosión (*yw*: *yellow-white*; *InR*: mutantes en el receptor de insulina). Diferentes letras en la misma columna muestran significancia estadística por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La disminución de triglicéridos reportada para machos *InR* tras el consumo de 1.5-4.0 % de PHM, coincidió con el aumento en su sobrevivencia (Cuadros 8 y 9), por lo que la reducción de triglicéridos bajo estas cantidades de PHM podría ser adecuada para el estado de salud de este grupo de moscas. Esta disminución de triglicéridos concuerda con lo reportado por Oyeniran *et al.* (2020), quienes informaron la reducción de alrededor de 30 % en los niveles de triglicéridos de moscas silvestres *Oregon* alimentadas desde su etapa larvaria con dieta alta en azúcares (15 y 30 % de sacarosa) y suplementada con una dosis única de PHM.

La reducción de los niveles de triglicéridos sugiere un aumento en la lipólisis, lo cual podría ser debido a una mayor expresión de la enzima *brummer* (homólogo de ATGL: lipasa adiposa de triglicéridos), ya que se ha informado sobre el incremento en la expresión de la enzima ATGL en ratones de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasas y 5 % de extracto de hojas de moringa rico

en isotiocianatos (Waterman *et al.*, 2015). Dado que en machos *InR* únicamente la suplementación con 5.5 % de PHM coincidió con la reducción de glucógeno (Cuadro 18), es posible que con esta dieta de PHM los machos *InR* estén consumiendo menor cantidad de alimento y, por lo tanto, estén utilizando sus reservas energéticas de triglicéridos.

En contraste con la reducción de lípidos totales reportada para la cepa *yw*, tanto en hembras como en machos (Cuadros 20 y 21), el aumento de los niveles de triglicéridos en esta cepa podría sugerir un incremento en las reservas energéticas en forma de triglicéridos y una reducción de otros lípidos, como el colesterol. Se ha reportado que los polifenoles presentes en el extracto metanólico de hojas de moringa son capaces de inhibir, *in vitro*, a la enzima HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-reductasa), responsable de la biosíntesis de colesterol (Reddy *et al.*, 2012). Al igual que en los mamíferos, la presencia de colesterol en las moscas es necesaria para la formación de hormonas esteroideas, entre ellas la hormona ecdisona, cuya función está relacionada con la transición de la etapa larvaria hacia la etapa de adulto (metamorfosis); otras funciones de esta hormona en la vida adulta del insecto están relacionadas con la línea germinal (Uryu *et al.*, 2015).

El incremento en los niveles de triglicéridos reportado tras la suplementación con ≥ 4.0 % de PHM podría sugerir un exceso de nutrientes en la dieta, lo que resulta en la reducción de la expresión de *brummer* y, por lo tanto, en una inhibición de la lipólisis debido a la señalización de TOR (Kuhnlein, 2012) y a la retención del factor de transcripción FOXO en el citoplasma (Heier & Kuhnlein, 2018). Esta alteración en el metabolismo y en la concentración de los lípidos tras la suplementación con 4.0 y 5.5 % de PHM podría explicar, en parte, la reducción en la sobrevivencia (Cuadros 8 y 9) y las alteraciones en el peso (Cuadros 11 y 12) reportadas para hembras y machos de la cepa *yw*.

A la fecha no existen reportes de los niveles de triglicéridos para hembras *InR* alimentadas con PHM, ni con algún otro tipo de *Brassica*, de manera que los resultados presentados en este trabajo son los primeros de esta índole. El mantenimiento, e incluso el incremento, en los niveles de triglicéridos reportados para estas moscas tras la suplementación con PHM descartaría la posibilidad de que la reducción de los niveles de glucógeno reportado anteriormente (Cuadro 19) haya sido resultado de la inanición, ya que, de haber sido así, las reservas de triglicéridos también habrían disminuido. Por lo tanto, es posible que hembras *InR* suplementadas con PHM estén consumiendo menor cantidad de alimento sin alterar su homeostasis energética, sugiriendo una regulación en el apetito posiblemente debido a la disminución del vaciamiento gástrico por el contenido de fibra insoluble:soluble presente en el PHM.

6.4. Integración de resultados por sexo (machos *yw* e *InR*; hembras *yw* e *InR*).

Las Figuras 6 y 7 muestran la integración de los efectos reportados tras la evaluación de todos los parámetros en ambas cepas, *yw* e *InR* de ambos sexos, suplementadas con las diferentes cantidades de PHM.

En moscas macho *yw*, las dietas con menor contenido de PHM (0.5–2.5 %) provocaron mejoría en la sobrevivencia y en los niveles de carbohidratos totales. Adicionalmente, se reportó regulación de glucosa y peso corporal con la dosis más baja de PHM. Por el contrario, la cantidad más alta de PHM ocasionó efectos adversos, entre ellos: reducción de sobrevivencia, aumento de peso, aumento de carbohidratos totales e incremento de triglicéridos.

En machos *InR* no se reportó la reducción de carbohidratos totales ni de glucosa; por el contrario, la suplementación con 5.5 % de PHM provocó el incremento de carbohidratos totales, sin aumentos significativos en los niveles de glucosa y glucógeno. En este mismo grupo de moscas, un efecto importante fue

que los lípidos totales disminuyeron con las dosis bajas de PHM (0.5–2.5 %), mientras que la sobrevivencia incrementó con las dietas de 1.5–4.0 % de PHM.

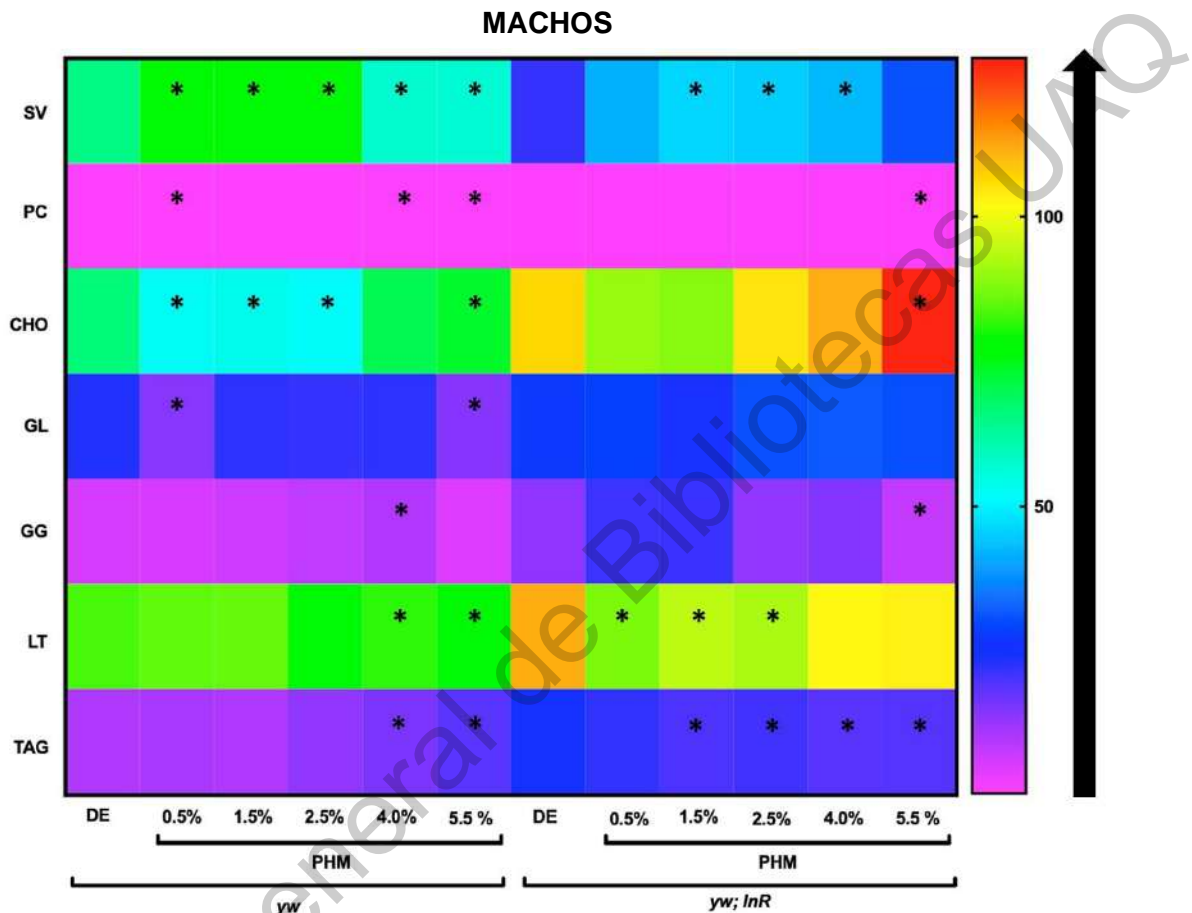


Figura 6. Efectos de las diferentes concentraciones de PHM sobre los parámetros evaluados en machos silvestres (*yw*) y mutantes (*InR*).

SV: Sobrevivencia (%); **PC:** Peso corporal (mg); **CHO:** Carbohidratos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **GL:** Glucosa ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **GG:** Glucógeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **LT:** Lípidos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **TAG:** Triglicéridos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso) / **DE:** Dieta estándar; **PHM:** Polvo de hojas de moringa. Asteriscos en los cuadros de la misma fila indican diferencias significativas respecto al control (DE) de la misma cepa (*yw* o *InR*) por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

En moscas hembra *yw*, la suplementación con 0.5–2.5 % de PHM provocó el incremento de la sobrevivencia, así como la reducción de lípidos totales y peso corporal. Además, se reportó la reducción de glucosa con la dosis más baja de PHM. Por el contrario, la suplementación más alta de PHM ocasionó efectos adversos en lo referente a la sobrevivencia, el peso corporal y los niveles de

triglicéridos. En hembras *InR* no se informó un efecto hipoglucemiante; no obstante, las dietas con menor contenido de PHM (0.5–2.5 %) provocaron la reducción de lípidos totales y el incremento en la sobrevivencia. En contraste, la suplementación más alta de PHM incrementó los niveles de triglicéridos para hembras *InR*.

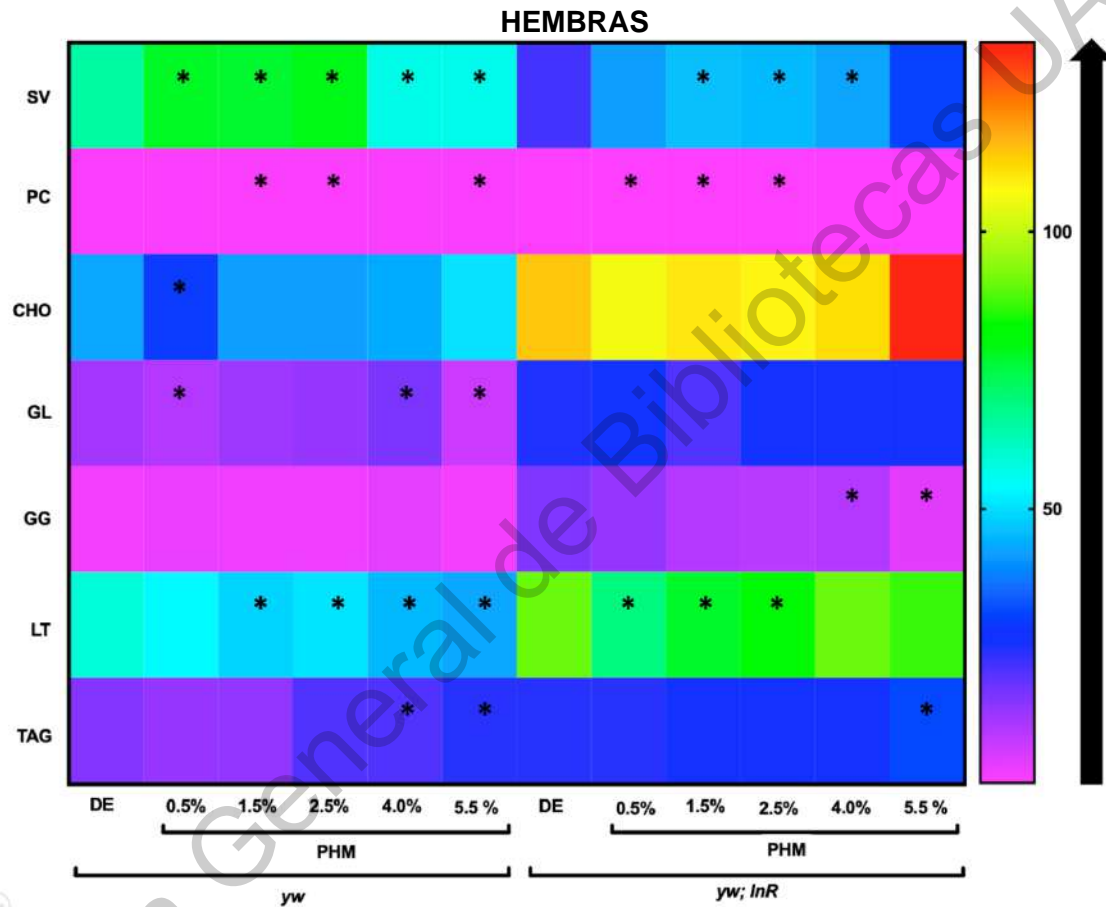


Figura 7. Efectos de las diferentes concentraciones de PHM sobre los parámetros evaluados en hembras silvestres (*yw*) y mutantes (*InR*).

SV: Sobrevivencia (%); **PC:** Peso corporal (mg); **CHO:** Carbohidratos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **GL:** Glucosa ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **GG:** Glucógeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **LT:** Lípidos totales ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso); **TAG:** Triglicéridos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso) / **DE:** Dieta estándar; **PHM:** Polvo de hojas de moringa. Asteriscos en los cuadros de la misma fila indican diferencias significativas respecto al control (DE) de la misma cepa (*yw* o *InR*) por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

El consumo crónico (> 4 semanas) de 0.5–2.5 % de PHM en la dieta podría ser recomendado para individuos masculinos sanos al promover la regulación sobre el peso, los niveles de carbohidratos totales y los niveles de glucosa. Las mismas

cantidades de PHM podrían ser sugeridas para individuos masculinos con diabetes tipo 2, como una alternativa para regular los niveles de lípidos totales.

Para individuos femeninos sanos, el consumo crónico de 0.5 % de PHM en la dieta podría ser apta por su regulación sobre los niveles de glucosa, mientras que las cantidades de 1.5 y 2.5 % de PHM podrían ser recomendadas por su efecto regulatorio sobre el peso y los lípidos totales. Mientras tanto, una dieta con 0.5 % de PHM podría resultar adecuada para sujetos femeninos con diabetes tipo 2 por su regulación sobre los niveles de lípidos, lo cual se podría verse reflejado en la calidad de vida.

Dirección General de Bibliotecas UFG

7. CONCLUSIONES.

Las hojas de moringa contienen nutrientes y compuestos bioactivos que pueden mejorar la calidad de vida de las cepas de *Drosophila melanogaster* en estudio. Dentro de esta composición destaca el porcentaje de proteína, así como el contenido de compuestos bioactivos, especialmente el total de fibra dietaria, compuestos fenólicos, como los flavonoides, y los glucosinolatos.

El consumo crónico de bajas cantidades de PHM provocó beneficios en las moscas *yellow-white* de ambos sexos en lo referente a la sobrevivencia, el peso corporal, así como los niveles de carbohidratos y de glucosa. Mientras que en la cepa *InR*, con un fenotipo de diabetes tipo 2, todos estos parámetros muestran alteraciones que repercuten en la calidad de vida, por lo que el consumo de las dietas con bajo contenido de PHM en esta cepa podría retardar el desarrollo de complicaciones asociadas a esta patología, debido a la disminución de lípidos totales, principalmente.

El consumo crónico de cantidades altas de PHM en la dieta provocó efectos tóxicos en las moscas *yellow-white* y en las moscas *InR* de ambos sexos. Entre estos efectos tóxicos se pueden enlistar una disminución de la sobrevivencia, aumento de peso, aumento en los niveles de carbohidratos totales y aumento en los niveles de triglicéridos. Esta toxicidad se presentó en cantidades diferentes de PHM entre la cepa *yellow-white* y la cepa *InR*, siendo la cepa *yellow-white* la más sensible a las altas dosis de PHM. Todos los resultados reportados mostraron diferencias dependientes del sexo del insecto, siendo las moscas macho las más afectadas.

Los resultados indican que el PHM no ejerce un efecto hipoglucemiante, después del consumo crónico, en moscas con una condición de diabetes tipo 2, ni tampoco llega a corregir el fenotipo de esta enfermedad. No obstante, sí favorece ciertos síntomas de la patología y, por lo tanto, la calidad de vida, lo cual se ve

reflejado en la sobrevivencia. Por lo anterior, resulta de importancia la realización de estudios de consumo de alimento en todas las dietas probadas, para una interpretación más concisa.

Asimismo, los resultados del presente trabajo sugieren que, una vez desarrollada la patología de diabetes mellitus tipo 2, el efecto hipoglucemiante de las hojas de moringa podría no presentarse después de su consumo crónico, por lo que sería adecuado considerar un tratamiento farmacológico eficiente. Adicionalmente, dada la mejora en otros parámetros alterados en esta patología, los resultados también llevan a sugerir la regulación del consumo crónico y de las altas cantidades de suplementos alimenticios no regulados.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Abderrazak, A., El Hadri, K., Bosc, E., Blondeau, B., Slimane, M., Buchele, B., Simmet, T., Couchie, D. & Rouis, M. (2016). Inhibition of the Inflammasome NLRP3 by Argabin Attenuates Inflammation, Protects Pancreatic β -Cells from Apoptosis, and Prevents Type 2 Diabetes Mellitus Development in ApoE2K1 Mice on a Chronic High-Fat Diet. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 357(3), pp.487-494.
- Abdull-Razis, A., Ibrahim, M. & Kntayya, S. (2014). Health Benefits of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20), pp.8571-8576.
- Abutair, A. S., Naser, I. A., & Hamed, A. T. (2018). The effect of soluble fiber supplementation on metabolic syndrome profile among newly diagnosed type 2 diabetes patients. *Clinical nutrition research*, 7(1), 31-39.
- ADA (2019) 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. (2018). *Diabetes Care*, 42(Supplement 1), pp. S13-S28.
- Ademiluyi, A. O., Aladeselu, O. H., Oboh, G., & Boligon, A. A. (2018). Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory properties of *Moringa* (*Moringa oleifera*) leaf. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2123-2133.
- Adisakwattana, S., & Chanathong, B. (2011). Alpha-glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringa oleifera* leaf extract. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(7), 803-808.
- Aekthammarat, D., Pannangpetch, P., & Tangsucharit, P. (2019). *Moringa oleifera* leaf extract lowers high blood pressure by alleviating vascular dysfunction and decreasing oxidative stress in L-NAME hypertensive rats. *Phytomedicine*, 54, 9-16.
- Agamou, J. A. A., Fombang, E. N., & Mbofung, C. M. (2015). Particular benefits can be attributed to *Moringa oleifera* Lam leaves based on origin and stage of

maturity. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(6), 541-555.

Aguirre, G., De Ita, J., de la Garza, R. & Castilla-Cortazar, I. (2016). Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), pp.3-26.

Ahmed, H. H., Metwally, F. M., Rashad, H., Zaazaa, A. M., Ezaat, S. M. & Salama, M. M. (2014). Moringa oleifera offers a multi-mechanistic approach for management of obesity in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 29(2), pp. 98-106.

Álvarez-Rendón, J. P. (2019). Caracterización de defectos metabólicos en *Drosophila melanogaster* por deficiencias en la señalización de la insulina. (Tesis de maestría). Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.

Álvarez-Rendón, J. P., & Riesgo-Escovar, J. R. (2020). Circadian and Rhythmic-Related Behavioral Co-Morbidities of the Diabetic State in *Drosophila melanogaster*. *General and Comparative Endocrinology*, 113477.

Álvarez-Rendón, J., Salceda, R. & Riesgo-Escovar, J. (2018). *Drosophila melanogaster* as a Model for Diabetes Type 2 Progression. *BioMed Research International*, 2018, pp.1-16.

Amaglo, N., Bennett, R., Lo Curto, R., Rosa, E., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Lo Curto, A., Crea, F. & Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4), 1047-1054.

AOAC Association of Official Analytical Chemists (2002). Official Methods of Analysis. 17th ed.; Arlington, VA. Methods: 920.87, 920.39, 925.10, 923.03.

Assefa, B., Mahmoud, A., Pfeiffer, A., Birkenfeld, A., Spranger, J. & Arafat, A. (2017). Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein-2, Independently of IGF-1,

Induces GLUT-4 Translocation and Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp.1-13.

Attakpa, E. S., Sangaré, M. M., Béhanzin, G. J., Ategbo, J. M., Seri, B., & Khan, N. A. (2017). Moringa olifeira Lam. stimulates activation of the insulin-dependent akt pathway. Antidiabetic effect in a diet-induced obesity (DIO) mouse model. *Folia biologica*, 63(2), 42.

Azad, S., Ansari, P., Azam, S., Hossain, S., Shahid, M., Hasan, M. & Hannan, J. (2017). Anti-hyperglycaemic activity of *Moringa oleifera* is partly mediated by carbohydrase inhibition and glucose-fibre binding. *Bioscience Reports*, 37(3), pp.1-11.

Baenas, N., Piegholdt, S., Schloesser, A., Moreno, D. A., García-Viguera, C., Rimbach, G., & Wagner, A. E. (2016). Metabolic activity of radish sprouts derived isothiocyanates in drosophila melanogaster. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 251.

Balusamy, S. R., Perumalsamy, H., Ranjan, A., Park, S., & Ramani, S. (2019). A dietary vegetable, Moringa oleifera leaves (drumstick tree) induced fat cell apoptosis by inhibiting adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of functional foods*, 59, 251-260.

Barbagallo, I., Vanella, L., Distefano, A., Nicolosi, D., Maravigna, A., Lazzarino, G., ... & VOLTI, G. (2016). Moringa oleifera Lam. improves lipid metabolism during adipogenic differentiation of human stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(24), 5223-5232.

Bennett, R., Mellon, F., Foidl, N., Pratt, J., Dupont, M., Perkins, L. & Kroon, P. (2003). Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi-Purpose Trees Moringa oleifera L. (Horseradish Tree) and Moringa stenopetala L. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51(12), 3546-3553.

- Beratarrechea, A. (2010). Las enfermedades crónicas (Primera parte). *Actualización en la práctica ambulatoria*. 13(2), pp.68-73.
- Besse-Patin, A., Jeromson, S., Levesque-Damphousse, P., Secco, B., Laplante, M., & Estall, J. L. (2019). PGC1A regulates the IRS1: IRS2 ratio during fasting to influence hepatic metabolism downstream of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4285-4290.
- Böhni, R., Riesgo Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B., Beckingham, K., & Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebral IRS1-4. *Cell*. (97), pp.865-875.
- Bridgemohan, P., Goordeen, A., Mohammed, M., & Bridgemohan, R. S. (2020). Review of the agro-ecology, phytochemistry, postharvest technology and utilization of moringa (*Moringa oleifera* Lam.). *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 3(2), 311-332.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., & Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*, 11(4), pp.213-221.
- Bross, T. G., Rogina, B., & Helfand, S. L. (2005). Behavioral, physical, and demographic changes in *Drosophila* populations through dietary restriction. *Aging cell*, 4(6), 309-317.
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.
- Caicedo-Lopez, L., Luzardo-Ocampo, I., Cuellar-Nuñez, M., Campos-Vega, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2019). Effect of the in vitro gastrointestinal digestion on free-phenolic compounds and mono/oligosaccharides from *Moringa oleifera* leaves: Bioaccessibility, intestinal permeability and antioxidant capacity. *Food Research International*, 120, pp.631-642.

- Calderín-Bouza, R., Yanes-Quezada, M., Yanes-Quezada, M., Cabrera-Rode, E., Fernández-Britto Rodríguez, J., & Jiménez-Paneque, R. (2014). Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in dyslipidemic patients. *Acta médica de Cuba*, 15(2).
- Cano-Rodríguez, I., & Ballesteros-Pomar, M. (2018). Terapias alternativas en diabetes. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 65(4), pp.189-191.
- Cantley, J., & Ashcroft, F. (2015). Q&A: insulin secretion and type 2 diabetes: why do β -cells fail?. *BMC Biology*, 13(1), p.33.
- Castillo-López, R., León-Félix, J., Angulo-Escalante, M., Gutiérrez-Dorado, R., Muy-Rangel, M., & Heredia, J. (2017). Nutritional and phenolic characterization of *Moringa oleifera* leaves grown in Sinaloa, México. *Pakistan Journal of Botany*, 49(1), pp.161-168.
- Ceddia, R., Somwar, R., Maida, A., Fang, X., Bikopoulos, G., & Sweeney, G. (2004). Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia*, 48(1), pp.132-139.
- Cervantes-Villagrana, R., & Presno-Bernal, J. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Revista de endocrinología y nutrición*, 21(3), pp.98-106.
- Charoensin, S. (2014). Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(7), pp.318-325.
- Chen, C., Jack, J., & Garofalo, R. (1996). The Drosophila insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology*, 137(3), pp.846-856.
- Chen, P. B., Kim, J. H., Young, L., Clark, J. M., & Park, Y. (2019). Epigallocatechin gallate (EGCG) alters body fat and lean mass through sex-dependent metabolic mechanisms in *Drosophila melanogaster*. *International journal of food sciences and nutrition*, 70(8), 959-969.

- Hietakangas, V., & Lemaitre, B. (2017). Physiological Adaptations to Sugar Intake: New Paradigms from *Drosophila melanogaster*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(2), pp.131-142.
- Cuellar-Nuñez, M., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gallegos-Corona, M., González de Mejía, E. and Loarca-Piña, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an *in vivo* AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food Research International*, 105, pp.159-168.
- Davies, L. R., Schou, M. F., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2018). Linking developmental diet to adult foraging choice in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 221(9), jeb175554.
- Deng, Q., Zinoviadou, K., Galanakis, C., Orlie, V., Grimi, N., Vorobiev, E., Lebovka, N., & Barba, F. (2015). The Effects of Conventional and Non-conventional Processing on Glucosinolates and Its Derived Forms, Isothiocyanates: Extraction, Degradation, and Applications. *Food Engineering Reviews*, 7(3), pp.357-381.
- Desphande, S.S., & Cheyran, M. (1987). Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.* 52, pp. 332-334.
- Dhar, A. S., Syed, M., & Romero, D. G. (2018). Development of Diet-Induced Insulin Resistance in *Drosophila melanogaster* and Characterization of the Anti-Diabetic Effects of Resveratrol and Pterostilbene. *Journal of emerging investigators*, 1-9.
- Divi, S. M., Bellamkonda, R. A. M. E. S. H., & Dasireddy, S. K. (2012). Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic potential of aqueous extract of *Moringa oleifera* in fructose fed insulin resistant and STZ induced diabetic wistar rats: A comparative study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(1), 67-72.

- Dong, Y., Sun, H., Yang, W., Ma, S., Du, B., & Xu, H. (2019). The Effect of Inulin on Lifespan, Related Gene Expression and Gut Microbiota in InRp5545/TM3 Mutant *Drosophila melanogaster*: A Preliminary Study. *Nutrients*, 11(3), 636.
- Dubnau, J. (2014). Behavioral genetics of the fly (*Drosophila melanogaster*). Cambridge: Cambridge University Press, p.162.
- Ecker, A., do Nascimento Gonzaga, T. K. S., Seeger, R. L., dos Santos, M. M., Loreto, J. S., Boligon, A. A., ... & Barbosa, N. V. (2017). High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 605-616.
- El-Sohaimy, S., Hamad, G., Mohamed, S., Amar, M., & Al-Hindi, R. (2015). Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 4(4), pp.188-199.
- Falowo, A., Muchenje, V., Hugo, A., Aiyegoro, O., & Fayemi, P. (2016). Antioxidant activities of *Moringa oleifera* L. and *Bidens pilosa* L. leaf extracts and their effects on oxidative stability of ground raw beef during refrigeration storage. *CyTA - Journal of Food*, 15(2), pp.249-256.
- Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., Garcia-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., ... & Loarca-Piña, G. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-induced colon cancer. *J Agric Food Chem*, 56, 8737-8744.
- Flybase (2019a). FlyBase Allele Report: Dmel\InR[E19]. [online] Flybase.org. Available at: <https://flybase.org/reports/FBaI0094021>
- Flybase (2019b). FlyBase Allele Report: Dmely[w]. [online] Flybase.org. Available at: <https://flybase.org/reports/FBaI0158456>.

- Forero, A., Hernández, J., Rodríguez, S., Romero, J., Morales, G., & Ramírez, G. (2018). La alimentación para pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 en tres hospitales públicos de Cundinamarca, Colombia. *Biomédica*, 38(3), pp.355-362.
- Förster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Müller, C., & Mewis, I. (2015). Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in *Moringa oleifera*. *Food Chemistry*, 166, pp.456-464.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4), p.327.
- Ghiridhari, V. V. A., Malhati, D., & Geetha, K. (2011). Anti-diabetic properties of drumstick (*Moringa oleifera*) leaf tablets. *International Journal of Health and Nutrition*, 2(1), 1-5.
- Goenaga, J. (2010). Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*: variación genética natural y su relación con longevidad y las reservas energéticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), pp.49-56.
- Graham, P., & Pick, L. (2017). *Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. *Current Topics in Developmental Biology*, 121, pp.397-419.

- Gupta, R., Mathur, M., Bajaj, V., Katariya, P., Yadav, S., Kamal, R., & Gupta, R. (2012). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of Diabetes*, 4(2), pp.164-171.
- Guzmán-Maldonado, S., Zamarripa-Colmenares, A., & Hernández-Durán, L. (2015). Calidad nutrimental y nutracéutica de hoja de moringa proveniente de árboles de diferente altura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(2), pp.317-330.
- Hafizur, R. M., Maryam, K., Hameed, A., Bano, S., Sumbul, S., Sana, A., ... & Faizi, S. (2018). Insulin releasing effect of some pure compounds from *Moringa oleifera* on mice islets. *Medicinal Chemistry Research*, 27(5), 1408-1418.
- Halban, P., Polonsky, K., Bowden, D., Hawkins, M., Ling, C., Mather, K., Powers, A., Rhodes, C., Sussel, L., & Weir, G. (2014). β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(6), pp.1983-1992.
- Hasan, G. (2017). IP3R-mediated Ca^{2+} release regulates protein metabolism in *Drosophila* neuroendocrine cells: implications for development under nutrient stress. *Development*, 144(8), 1484-1489.
- Heier, C., & Kühnlein, R. P. (2018). Triacylglycerol metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 210(4), 1163-1184.
- Hernández, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., Gómez, L., y Gaona, E. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016). [online] Gob.mx. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>.
- IMSS (2014). Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 en el primer nivel de Atención. México: CENETEC.
- INEGI. (2018). Características de las defunciones registradas en México durante 2017. [ebook] México. Disponible en:

<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemografico/DEFUNCIONES2017.pdf>.

- Jaafaru, M. S., Nordin, N., Rosli, R., Shaari, K., Saad, N., Noor, N. M., & Razis, A. F. A. (2019). Neuroprotective effects of glucomoringin-isothiocyanate against H₂O₂-Induced cytotoxicity in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Neurotoxicology*, 75, 89-104.
- Jaiswal, D., Rai, P., Mehta, S., Chatterji, S., Shukla, S., Rai, D., Sharma, G., Sharma, B., khair, S., & Watal, G. (2013). Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(6), pp.426-432.
- Jaja-Chimedza, A., Graf, B., Simmler, C., Kim, Y., Kuhn, P., Pauli, G., & Raskin, I. (2017). Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. *PLoS ONE*, 12(8), p. e0182658.
- Jaja-Chimedza, A., Zhang, L., Wolff, K., Graf, B., Kuhn, P., Moskal, K., Carmouche, R., Newman, S., Salbaum, J., & Raskin, I. (2018). A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome. *Journal of Functional Foods*, 47, pp.376-385.
- Jang, T., & Lee, K. P. (2018). Comparing the impacts of macronutrients on life-history traits in larval and adult *Drosophila melanogaster*: the use of nutritional geometry and chemically defined diets. *Journal of Experimental Biology*, 221(21), jeb181115.
- Jimoh, T. O. (2018). Enzymes inhibitory and radical scavenging potentials of two selected tropical vegetable (*Moringa oleifera* and *Telfairia occidentalis*) leaves relevant to type 2 diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 73-79.

- Joung, H., Kim, B., Park, H., Lee, K., Kim, H., Sim, H., Do, H., Hyun, C. and Do, M. (2017). Fermented *Moringa oleifera* Decreases Hepatic Adiposity and Ameliorates Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Journal of Medicinal Food*, 20(5), pp.439-447.
- Kharroubi, A., & Darwish, H. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6), pp.850-867.
- Kitamura, S., Morisseau, C., Harris, T. R., Inceoglu, B., & Hammock, B. D. (2017). Occurrence of urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors from the plants in the order Brassicales. *PloS one*, 12(5), e0176571.
- Kuhnlein, R. P. (2012). Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. *Journal of lipid research*, jlr-R024299.
- Kumari, D. J. (2010). Hypoglycaemic effect of *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica* in type 2 diabetes mellitus. *Bioscan*, 5(20), 211-214.
- Lalas, S., Athanasiadis, V., Karageorgou, I., Batra, G., Nanos, G. D., & Makris, D. P. (2017). Nutritional characterization of leaves and herbal tea of *Moringa oleifera* cultivated in Greece. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 23(4), 320-333.
- Lee, K., Kwon, O., Lee, J., Kwon, K., Min, K., Jung, S., Kim, A., You, K., Tatar, M., & Yu, K. (2008). *Drosophila* short neuropeptide F signalling regulates growth by ERK-mediated insulin signalling. *Nature Cell Biology*, 10(4), pp.468-475.
- Leone, A., Bertoli, S., Di Lello, S., Bassoli, A., Ravasenghi, S., Borgonovo, G., ... & Battezzati, A. (2018). Effect of *Moringa oleifera* leaf powder on postprandial blood glucose response: In vivo study on Saharawi people living in refugee camps. *Nutrients*, 10(10), 1494.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology

of *Moringa oleifera* Leaves: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp.12791-12835.

Lopez, T. E., Pham, H. M., Barbour, J., Tran, P., Van Nguyen, B., Hogan, S. P., ... & Jafari, M. (2016). The impact of green tea polyphenols on development and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of functional foods*, 20, 556-566.

López-López, A., Jaime, H., Escobar Villanueva, M., Padilla, M., Palacios, G., & Aguilar, F. (2016). Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiology & Behavior*, 161, pp.15-23.

López-Ramos, F. (2010). Epidemiología: Enfermedades transmisibles. 3ª ed. México: El Manual Moderno, p.64.

Lopez-Rodriguez, N. A., Gaytán-Martínez, M., de la Luz Reyes-Vega, M., & Loarca-Piña, G. (2020). Glucosinolates and Isothiocyanates from *Moringa oleifera*: Chemical and Biological Approaches. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1-11.

Lozano-Baena, M. D., Tasset-Cuevas, I., Obregón, S., Haro Bailón, A. D., Muñoz Serrano, A., & Alonso Moraga, Á. (2015). Antigenotoxicity and tumor growing inhibition by leafy *Brassica carinata* and sinigrin. *Molecules*, 20, 15748-15765.

Lozinsky, O. V., Lushchak, V., Kryshchuk, N. I., Shchypanska, N. Y., Riabkina, A. H., Skarbek, S. V., ... & Lushchak, V. I. (2013). S-nitrosoglutathione-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*: delayed pupation and induced mild oxidative/nitrosative stress in eclosed flies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(1), 162-170.

MacMillan, H. A., Nørgård, M., MacLean, H. J., Overgaard, J., & Williams, C. J. (2017). A critical test of *Drosophila* anaesthetics: Isoflurane and sevoflurane are benign alternatives to cold and CO₂. *Journal of insect physiology*, 101, p.97-106.

- Magaji, U. F., Sacan, O., & Yanardag, R. (2020). Alpha amylase, alpha glucosidase and glycation inhibitory activity of *Moringa oleifera* extracts. *South African Journal of Botany*, 128, 225-230.
- Maizuwo, A., Hassan, A., Momoh, H., & Muhammad, J. (2017). Phytochemical Constituents, Biological Activities, Therapeutic Potentials and Nutritional Values of *Moringa oleifera* (Zogale): A Review. *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*, 3(4), pp.60-66.
- Maldini, M., Maksoud, S., Natella, F., Montoro, P., Petretto, G., Foddai, M., De Nicola, G., Chessa, M., & Pintore, G. (2014). 'Moringa oleifera: study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry'. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9), pp.900-910.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of cereal science*, 73, 40-45.
- Matsuda, H., Yamada, T., Yoshida, M., & Nishimura, T. (2015). Flies without trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), pp.1244-1255.
- Mawlong, I., Sujith Kumar, M. S., Gurung, B., Singh, K. H., & Singh, D. (2017). A simple spectrophotometric method for estimating total glucosinolates in mustard de-oiled cake. *International journal of food properties*, 20(12), 3274-3281.
- Mbikay, M. (2012). Therapeutic Potential of *Moringa oleifera* Leaves in Chronic Hyperglycemia and Dyslipidemia: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 3.
- Mealey, B. & Ocampo, G. (2007). Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 44(1), pp.127-153.
- Melo, V., Vargas, N., Quirino, T., & Calvo, C. (2013). *Moringa oleifera* L. An underutilized tree with macronutrients for human health. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(10), pp.785-789.

- Menéndez-García, R., Gómez-Vázquez, D. y Lardoeyt-Ferrer, R. (2015). Contribución de la interacción del genoma y el ambiente en la aparición de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de Ciencias Médicas*, 19(3), pp.465-477.
- Metwally, F. M., Rashad, H. M., Ahmed, H. H., Mahmoud, A. A., Raouf, E. R. A., & Abdalla, A. M. (2017). Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of *Moringa oleifera* in the experimental model. *Asian Pacific Journal of tropical biomedicine*, 7(3), 214-221.
- Miani, M., Barthson, J., Colli, M., Brozzi, F., Cnop, M., & Eizirik, D. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensitizes pancreatic beta cells to interleukin-1 β -induced apoptosis via Bim/A1 imbalance. *Cell Death & Disease*, 4(7), p. e701.
- Minaz, N., Razdan, R., Hammock, B. D., & Goswami, S. K. (2018). An inhibitor of soluble epoxide hydrolase ameliorates diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 136, 84-89.
- Moyo, B., Masika, P., Arnold, H., & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), pp.12925-12933.
- Mukunzi, D., Nsor-Atindana, J., Xiaoming, Z., Gahungu, A., Karangwa, E., Mukamurezi, G., & Arief, N. J. (2011). Comparison of volatile profile of *Moringa oleifera* leaves from Rwanda and China using HS-SPME. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(7), 602-608.
- Murillo-Maldonado, J. M., Sánchez-Chávez, G., Salgado, L. M., Salceda, R., & Riesgo-Escovar, J. R. (2011). *Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*, 60(5), 1632-1636.
- Musselman, L. P., & Kühnlein, R. P. (2018). *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), p.jeb163881.

- Musselman, L. P., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S. S., Cagan, R. L., & Baranski, T. J. (2011). A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease models & mechanisms*, 4(6), 842-849.
- Nässel, D. & Broeck, J. (2015). Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2), pp.271-290.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Nobossé, P., Fombang, E. N., & Mbofung, C. M. (2018). Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh *Moringa oleifera* L. leaves. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2188-2198.
- Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Diario oficial de la federación*.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y listados de los residuos peligrosos. *Diario oficial de la federación*.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. *Diario oficial de la federación*.
- Olayaki, L. A., Irekpita, J. E., Yakubu, M. T., & Ojo, O. O. (2015). Methanolic extract of *Moringa oleifera* leaves improves glucose tolerance, glycogen synthesis and lipid metabolism in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 26(6), 585-593.

- Olson, M. E., Sankaran, R. P., Fahey, J. W., Grusak, M. A., Odee, D., & Nouman, W. (2016). Leaf protein and mineral concentrations across the "Miracle Tree" genus *Moringa*. *PLoS one*, 11(7).
- Olson, M. & Fahey, J. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, pp.1071-1082.
- Omodanisi, E., Aboua, Y., & Oguntibeju, O. (2017). Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa Oleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. *Molecules*, 22(4), p. 439.
- OMS. (2018a). Enfermedades no transmisibles. [online] Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/noncommunicable-diseases>.
- OMS. (2018b). Noncommunicable diseases country profiles 2018. 3rd ed. Switzerland: *World Health Organization*, p.138.
- Oomah, D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G., (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Sci. Food. Agric.*, 85, pp. 935-942.
- Otero-Moreno, D., Murillo-Maldonado, J. M., & Riesgo-Escovar, J. R. (2019). Diet composition differentially affects insulin pathway compromised and control flies. *BioMed research international*, 2019.
- Otero-Moreno, D., Peña-Rangel, M., & Riesgo-Escovar, J. (2016). Crecimiento y Metabolismo: La regulación y la vía de la Insulina desde la Mosca de la Fruta, *Drosophila melanogaster*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2), pp.116-126.
- Oyeniran, O. H., Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2020). Modulatory effects of moringa (*Moringa oleifera* L.) leaves infested with African mistletoe (*Tapinanthus bangwensis* L.) on the antioxidant, antidiabetic, and neurochemical indices in

high sucrose diet-induced diabetic-like phenotype in fruit flies (*Drosophila melanogaster* M.). *Journal of Food Biochemistry*, e13318.

Palanker, L., Tennessen, J. M., Lam, G., & Thummel, C. S. (2009). *Drosophila* HNF4 regulates lipid metabolism and B-oxidation. *Cell metabolism*, 9, pp. 228-239.

Paliwal, R., Sharma, V., & Pracheta, J. (2011). A Review on Horse Radish Tree (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Tree with High Economic and Commercial Importance. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(4), pp.317-328.

Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M. (2018). Palmitic and oleic acid: the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(3), 178-190.

Paula, P., Sousa, D., Oliveira, J., Carvalho, A., Alves, B., Pereira, M., Farias, D., Viana, M., Santos, F., Morais, T., & Vasconcelos, I. (2017). A Protein Isolate from *Moringa oleifera* Leaves Has Hypoglycemic and Antioxidant Effects in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Molecules*, 22(2), p.271.

Poças, G. M., Crosbie, A. E., & Mirth, C. K. (2020). When does diet matter? The roles of larval and adult nutrition in regulating adult size traits in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 104051.

Post, S., & Tatar, M. (2016). Nutritional Geometric Profiles of Insulin/IGF Expression in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 11(5), p. e0155628.

Prabakaran, M., Kim, S. H., Sasireka, A., Chandrasekaran, M., & Chung, I. M. (2018). Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*. *Food bioscience*, 26, 23-29.

Rajanandh, M., Satishkumar, M., Elango, K., & Suresh, B. (2012). *Moringa oleifera* Lam. A herbal medicine for hyperlipidemia: A pre-clinical report. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, pp.790-795.

- Reddy, V. P., Ahmed, F., & Urooj, A. (2012). Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a (hmg co-a) reductase in liver microsomes by Moringa Oleifera L. polyphenols. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(8), 2510.
- Reed, L., Williams, S., Springston, M., Brown, J., Freeman, K., DesRoches, C., Sokolowski, M., & Gibson, G. (2010). Genotype-by-Diet Interactions Drive Metabolic Phenotype Variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 185(3), pp.1009-1019.
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C. L., Ulgherait, M., Hur, J. H., ... & Walker, D. W. (2011). Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell metabolism*, 14(5), 623-634.
- Reyes-DelaTorre, A., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2012). Carbohydrate metabolism in *Drosophila*: reliance on the disaccharide trehalose. *Carbohydrates—comprehensive studies on glycobiology and glycototechnology*. InTech, 317-38.
- Ríos, J., Francini, F., & Schinella, G. (2016). Productos naturales para el tratamiento de la diabetes (I): Mecanismos de acción. *Revista de Fitoterapia*, 16(1), pp.17-31.
- Rodrigues, M. A., Martins, N. E., Balancé, L. F., Broom, L. N., Dias, A. J., Fernandes, A. S. D., ... & Mirth, C. K. (2015). *Drosophila melanogaster* larvae make nutritional choices that minimize developmental time. *Journal of insect physiology*, 81, 69-80.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246-254.

- Roginsky, V., & Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*, 92(2), 235-254.
- Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Martínez, M., Olivar, L., Nava, M., Tomey, D., Rojas, M., Salazar, J., Garicano, C., & Velasco, M. (2018). Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *Journal of Diabetes Research*, 2018. pp.1-19.
- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C., Zárate-Rojas, E., Villalpando, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2018). Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Pública de México*, 60(3), pp.224-232.
- Rovenko, B. M., Perkhulyan, N. V., Gospodaryov, D. V., Sanz, A., Lushchak, V., & Lushchak, V. I. (2015). High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 180, 75-85.
- Ruud, A. F., Lam, G., & Thummel, C. S. (2011). The *Drosophila* NR4A nuclear receptor DHR38 regulates carbohydrate metabolism and glycogen storage. *Molecular endocrinology*, 25(1), 83-91.
- Salinas-Contreras, R., & Hiriart, M. (2016). Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 ¿factores de riesgo para desarrollar enfermedad de Alzheimer?. *Archivos de neurociencias*, 21, pp.88-94.
- Santalla, M., Portiansky, E., & Ferrero, P. (2016). *Drosophila melanogaster*, an Emerging Animal Model for the Study of Human Cardiac Diseases. *Revista argentina de cardiología*, 84(5), pp.424-430.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.

- Schwasinger-Schmidt, T. E., Kachman, S. D., & Harshman, L. G. (2012). Evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*: measurement of direct and correlated responses to artificial selection. *Journal of evolutionary biology*, 25(2), 378-387.
- Secretaría de Salud (2011). Manual para el manejo de los residuos peligrosos de tipo químico (CRETI) [online] Inper.mx. Available at: <http://www.inper.mx/descargas/pdf/CRETI.pdf>.
- Semaniuk, U. V., Gospodaryov, D. V., Feden'ko, K. M., Yurkevych, I. S., Vaiserman, A. M., Storey, K. B., ... & Lushchak, O. (2018). Insulin-like peptides regulate feeding preference and metabolism in *Drosophila*. *Frontiers in physiology*, 9, 1083.
- Senyilmaz-Tiebe, D., Pfaff, D. H., Virtue, S., Schwarz, K. V., Fleming, T., Altamura, S., & Teleman, A. A. (2018). Dietary stearic acid regulates mitochondria in vivo in humans. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
- Shiga, M., Lajolo, M., & Filisetti, M. (2003). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Cienc. Tenol. Aliment. Caminas* 23, pp. 141-148.
- Singh, B., Singh, B., Singh, R., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., & Singh, H. (2009). Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), pp.1109-1116.
- Singh, D., Arya, P., Aggarwal, V., & Gupta, R. (2014). Evaluation of Antioxidant and Hepatoprotective Activities of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats. *Antioxidants*, 3(3), pp.569-591.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- Staats, S., Lüersen, K., Wagner, A., & Rimbach, G. (2018). *Drosophila melanogaster* as a Versatile Model Organism in Food and Nutrition Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(15), pp.3737-3753.
- Stobdan, T., Sahoo, D., Azad, P., Hartley, I., Heinrichsen, E., Zhou, D., & Haddad, G. G. (2019). High fat diet induces sex-specific differential gene expression in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 14(3).
- Taweerutchana, R., Lumlerdkij, N., Vannasaeng, S., Akarasereenont, P., & Sriwijitkamol, A. (2017). Effect of Moringa oleifera Leaf Capsules on Glycemic Control in Therapy-Naïve Type 2 Diabetes Patients: A Randomized Placebo Controlled Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, pp.1-6.
- Teleman, A. A., Chen, Y. W., & Cohen, S. M. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & development*, 19(16), 1844-1848.
- Tende, J., Ezekiel, I., Dikko, A., & Goji, A. (2011). Effect of Ethanolic Leaves Extract of Moringa oleifera on Blood Glucose Levelsof Streptozocin-Induced Diabetics and Normoglycemic Wistar Rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(1), pp.1-4.
- Tennessen, J. M., Barry, W. E., Cox, J., & Thummel, C. S. (2014). Methods for studying metabolism in *Drosophila*. *Methods*, 68(1), 105-115.
- Toshniwal, A. G., Gupta, S., Mandal, L., & Mandal, S. (2019). ROS inhibits cell growth by regulating 4EBP and S6K, independent of TOR, during development. *Developmental cell*, 49(3), 473-489.
- Tshingani, K., Donnen, P., Mukumbi, H., Duez, P., & Dramaix-Wilmet, M. (2017). Impact of Moringa oleifera lam. Leaf powder supplementation versus nutritional counseling on the body mass index and immune response of HIV patients on

antiretroviral therapy: a single-blind randomized control trial. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 420.

- Tumer, T. B., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Raskin, I., & Waterman, C. (2015). Direct and indirect antioxidant activity of polyphenol-and isothiocyanate-enriched fractions from *Moringa oleifera*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(5), 1505-1513.
- Udechukwu, M., Abbey, L., Nwodo, U. and Udenigwe, C. (2018). Potential of *Moringa oleifera* seeds and leaves as functional food ingredients for human health promotion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(1), pp.1-14.
- Uryu, O., Ameku, T., & Niwa, R. (2015). Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoological letters*, 1(1), 1-9.
- Valdez-Solana, M., Mejía-García, V., Téllez-Valencia, A., García-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J., & Sierra-Campos, E. (2015). Nutritional Content and Elemental and Phytochemical Analyses of *Moringa oleifera* Grown in Mexico. *Journal of Chemistry*, 2015, pp.1-9.
- Van Handel, E. (1985a). Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1(3), pp. 299-301.
- Van Handel, E. (1985b). Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1(3), pp. 302-304.
- Viková, J., Collinsová, M., Kletvíková, E., Buděšínský, M., Kaplan, V., Žáková, L., Veverka, V., Hexnerová, R., Aviñó, R., Straková, J., Selicharová, I., Vaněk, V., Wright, D., aWatson, C., Turkenburg, J., Brzozowski, A., & Jiráček, J. (2016). Rational steering of insulin binding specificity by intra-chain chemical crosslinking. *Scientific Reports*, 6(1), pp.1-12.
- Wagner, A. E., Piegholdt, S., Rabe, D., Baenas, N., Schloesser, A., Eggersdorfer, M., ... & Rimbach, G. (2015). Epigallocatechin gallate affects glucose

metabolism and increases fitness and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Oncotarget*, 6(31), 30568.

- Waterman, C., Cheng, D., Rojas-Silva, P., Poulev, A., Dreifus, J., Lila, M., & Raskin, I. (2014). Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation in vitro. *Phytochemistry*, 103, pp.114-122.
- Waterman, C., Rojas-Silva, P., Tumer, T. B., Kuhn, P., Richard, A. J., Wicks, S., ... & Raskin, I. (2015). Isothiocyanate-rich *Moringa oleifera* extract reduces weight gain, insulin resistance, and hepatic gluconeogenesis in mice. *Molecular nutrition & food research*, 59(6), 1013-1024.
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, A. F. (2018). Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes. *The Journal of nutrition*, 148(1), 7-12.
- Yamada, T., Habara, O., Kubo, H., & Nishimura, T. (2018). Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. *Development*, 145(6), dev158865.
- Yassa, H. D., & Tohamy, A. F. (2014). Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. *Acta Histochemica*, 116(5), 844-854.
- Yasugi, T., Yamada, T., & Nishimura, T. (2017). Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in *Drosophila*. *Scientific reports*, 7(1), p.1619.
- Yates, T., Henson, J., Edwardson, C., Dunstan, D., Bodicoat, D., Khunti, K. & Davies, M. (2015). Objectively measured sedentary time and associations with insulin sensitivity: Importance of reallocating sedentary time to physical activity. *Preventive Medicine*, 76, pp.79-83.
- Zaccardi, F., Webb, D., Yates, T., & Davies, M. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 92(1084), pp.63-69.

Zhang, J., Liu, Y., Jiang, K., & Jia, J. (2020). Hedgehog signaling promotes lipolysis in adipose tissue through directly regulating Bmm/ATGL lipase. *Developmental Biology*, 457(1), 128-139.

Dirección General de Bibliotecas UAQ