



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Laboratorio de Bioquímica

TESIS

“Evaluación del efecto antioxidante del fruto de *Potentilla indica* en pulmones de ratas diabéticas”

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Brian Gómez Chávez

Asesor:

D.C. Alfredo Saavedra Molina

Co-Asesor:

D. C. Ruth Noriega Cisneros

MORELIA, MICH., MARZO 2018

Dedicatoria

A mi esposa, **Malinali**, por su gran amor, su confianza, sus enseñanzas, su apoyo incondicional brindado hacia mí y por hacerme muy feliz, Te amo.

A mis padres, **Rogelio** y **Martha Alicia**, por su gran amor, su apoyo incondicional, su confianza, sus buenos deseos y sus palabras de aliento.

A mis hermanos, **Jesse William** y **Roger Joseph**, por su cariño, su confianza, sus buenos deseos y sus palabras de aliento.

Al Dr. **Saavedra** y a **Mónica**, por brindarme su apoyo, su amistad, sus consejos y por hacerme muy grata mi estancia en el laboratorio de bioquímica.

A la Dra. **Ruth**, por brindarme su gran apoyo, sus buenos consejos, su amistad, su confianza y por su tiempo.

Índice

Dedicatoria.....	i
Índice	ii
Índice de figuras	iv
Índice de cuadros	v
Lista de abreviaturas	vi
Agradecimientos	ix
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1 Diabetes mellitus (DM)	5
3.1.1 Clasificación de la DM	5
3.2 Complicaciones de la DM	7
3.2.1 Complicaciones macrovasculares	7
3.2.1.1 Arterioesclerosis	8
3.2.1.2 Dislipidemias	8
3.2.2 Complicaciones microvasculares	9
3.2.2.1 Nefropatía diabética.....	9
3.2.2.2 Retinopatía diabética	10
3.2.2.3 Neuropatía diabética.....	10
3.2.2.4 Microangiopatía pulmonar diabética	11
3.3 Pulmón y la DM.....	11
3.3.1 Pulmón.....	11
3.3.2 Transportadores de glucosa.....	13
3.3.2.1 Transportadores de glucosa en pulmón	14
3.3.3 Complicaciones pulmonares causadas por DM	15
3.4 La DM y el estrés oxidante	16
3.4.1 Lipoperoxidación en la DM	17
3.5 Antioxidantes	18

3.6	Metabolitos secundarios de plantas y sus propiedades antioxidantes	19
3.6.1	Terpenos.....	20
3.6.2	Compuestos fenólicos	21
3.6.3	Compuestos que contienen nitrógeno	22
3.6.3.1	Alcaloides	22
3.6.3.2	Glucósidos	22
3.7	Uso de plantas medicinales en el tratamiento de la DM.....	23
3.7.1	<i>Potentilla indica o Duchesnea indica</i>	25
4.	Justificación.....	28
5.	Hipótesis	29
6.	Objetivos.....	30
7.	Materiales y Métodos	31
8.	Resultados.....	40
9.	Discusión	74
10.	Resumen de resultados	78
11.	Conclusión	79
12.	Perspectivas	80
13.	Referencias	81

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de los alveolos.....	13
Figura 2. Generación de aldehídos lipídicos reactivos	18
Figura 3. Planta de <i>P. indica</i>	26
Figura 4. Las estructuras químicas de las antocianinas identificadas en el fruto de <i>P. indica</i>	27
Figura 5. Inhibición de la lipoperoxidación en mitocondrias de pulmón inducida por hierro	43
Figura 6. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre los niveles de glucosa	45
Figura 7. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre el peso	47
Figura 8. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre el consumo de alimento	49
Figura 9. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre el consumo de agua.	51
Figura 10. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre los niveles de lipoperoxidación en suero	53
Figura 11. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre los niveles de glucosa al final del tratamiento	55
Figura 12. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre los niveles de colesterol.....	57
Figura 13. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre los niveles de TAG	59
Figura 14. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la actividad del Complejo I.	61
Figura 15. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la actividad del Complejo II.	63
Figura 16. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la actividad del Complejo III.....	65
Figura 17. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la actividad del Complejo IV.	67
Figura 18. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la lipoperoxidación en mitocondrias de pulmón.....	69
Figura 19. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la actividad de la GPx en mitocondrias de pulmón.....	71

Figura 20. Efecto del extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i> sobre la actividad de la SOD en mitocondrias de pulmón.....	73
---	----

Índice de cuadros

Cuadro 1. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en frutas de Yucatán.....	25
Cuadro 2. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en el extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i>	40
Cuadro 3. Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH· y el ensayo del porcentaje de eliminación de H ₂ O ₂ el extracto metanólico del fruto de <i>P. indica</i>	41

Lista de abreviaturas

AC: Átomos de carbono

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

C-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad

CHE: Colesterol esterasa

CH₃O₂K: Acetato de potasio

C-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad

CoQ: Coenzima Q

DAP: Dihidroxiacetona fosfato

DCIP: 2,6 diclorofenolindo fenol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EM: Espectrometría de masas

ER: Especies reactivas

ERC: Especies reactivas de cobre

ERH: Especies reactivas de hierro

ERN: Especies reactivas nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FEV1: Volumen espiratorio forzado en un segundo

FVC: Capacidad vital forzada

GK: Glicerol quinasa

GLUT: Transportadores de glucosa independientes de sodio

GOD: Glucosa oxidasa

GPO: Glicerolfosfato deshidrogenasa

GPx: Glutación peroxidasa

GQ: Glucoquinasa

G3P: Glicerol-3-fosfato

DM: Diabetes mellitus

HCl: Ácido clorhídrico

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

IL: Interleucina

KCN: Cianuro de potasio

K₃Fe(CN)₆: Ferrocianuro de potasio

KH₂PO₄: Fosfato de potasio monobásico

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

MDA: Malondialdehído

MS: Metabolitos secundarios

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

NO: Óxido nítrico

NOX: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

O₂⁻: Anión superóxido

OH⁻: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Peroxinitrito

POD: Peroxidasa

RL: Radicales libres

SGLT: Transportadores de glucosa dependientes de sodio

SOD: Superóxido dismutasa

STZ: Estreptozotocina

TAG: Triacilglicéridos

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TLC: Capacidad pulmonar total

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VN: Vía nasa

VO: Vía oral

Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina y a la Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero, por su amistad, su asesoría y su apoyo recibido durante la realización de este trabajo y por haberme recibido en su laboratorio, siempre se lo agradeceré por ayudarme en mi titulación.

A la Dra. Ruth Noriega Cisneros, por su amistad, su asesoría, sus consejos y su gran apoyo durante la realización de este trabajo y por haberme recibido en su laboratorio clínico.

*Al Dr. Rafael Salgado Garciglia, por su amistad, su asesoría y su apoyo recibidos durante la realización de éste trabajo y por haberme recibido en su laboratorio para la obtención de la planta de *P. indica* y la elaboración del extracto metanólico de su fruto.*

Al Dr. Salvador Manzo Ávalos, por su amistad, sus consejos y su apoyo prestado.

Al Dr. Gerardo Rosas Trejo, por su amistad y su apoyo prestado.

A mi esposa Malinali Ambriz Ortiz, por sus consejos y apoyo brindado.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y en particular al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas por mi formación académica.

Tesis apoyada por **CONACYT** a través de la beca 598338.

1. Resumen

La diabetes mellitus (DM) se describe como un trastorno metabólico de múltiples etiologías caracterizado por hiperglucemia crónica, resultante de defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambos, lo que conduce a anormalidades en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas y un aumento en el estrés oxidante. Como resultado, da lugar al desarrollo de sus complicaciones y el deterioro de diversos órganos, incluidos los pulmones, ya que provoca insuficiencia pulmonar y agrava la condición diabética. La incidencia de la DM crece de manera acelerada, lo que aumenta la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamientos más efectivos y seguros que las que se encuentran hoy en día en el mercado. Una alternativa es el uso de plantas medicinales debido a que hay diversos estudios que muestran un efecto terapéutico para distintos padecimientos. *Potentilla indica* (*P. indica*), conocida comúnmente como “fresa de la India”, se ha utilizado en Asia en la medicina tradicional para el tratamiento de la lepra, la inflamación, hipoglucemiante, antioxidante y anticancerígeno. Por lo anterior, fue de interés evaluar el efecto del consumo del extracto metanólico del fruto de *P. indica*. Este trabajo plantea que el fruto de *P. indica* presenta actividad antioxidante y que puede disminuir las complicaciones de la DM provocadas en los pulmones. Para comprobarlo, se evaluó el efecto del consumo del extracto metanólico del fruto de *P. indica* en ratas diabéticas cuando se administró vía oral (VO) y vía nasal (VN) a una concentración de 25mg/kg de peso durante 30 días. Se cuantificó el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides y se evaluó el efecto antioxidante *in vitro*. Al terminar el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas, se recolectó la sangre para la cuantificación de los niveles de glucosa, lípidos (colesterol y triacilglicéridos) y determinar los niveles de lipoperoxidación en suero. Se obtuvieron las mitocondrias de pulmón para evaluar la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales, determinar los niveles de lipoperoxidación y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Los resultados *in vitro* mostraron un elevado contenido de ácidos fenólicos y flavonoides y una elevada actividad antioxidante. Los resultados *in vivo* de la administración del extracto metanólico del fruto de *P. indica* en ratas diabéticas, mostraron que no tiene efecto hipoglucémico e

hipolipemiente al ser administrado VO y VN. En cuanto a la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I, II, III y IV, presentó una tendencia a mejorar su actividad cuando se administró VO y VN. En cuanto a la actividad antioxidante, el extracto tuvo un efecto significativo al reducir la lipoperoxidación en suero y mitocondrias de pulmón, además mostró una tendencia a aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx. En conclusión, se considera que la administración VO y VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica*, no controla la hiperglucemia ni el perfil de lípidos, pero reduce el daño oxidativo provocado por la diabetes.

Palabras clave: Diabétes mellitus, Planta medicinal, Actividad biológica, Estrés oxidante, Antioxidante.

2. Abstract

Diabetes mellitus (DM) is described as a metabolic disorder of multiple etiologies characterized by chronic hyperglycemia, resulting from defects in the secretion or action of insulin, or both, which leads to abnormalities in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins and an increase in oxidative stress, which leads to the development of its complications and the deterioration of various organs, including the lungs, causing pulmonary insufficiency, which aggravates the diabetic condition. The incidence of DM grows rapidly, which increases the need to find new treatment alternatives more effective and safe than those found on the market today. An alternative is the use of medicinal plants as treatment because there are several studies carried out on plants that show a therapeutic effect for different conditions. *Potentilla indica* (*P. indica*), commonly known as "strawberry from India", has been used in traditional medicine in Asia for the treatment of leprosy, inflammation, hypoglycaemia, antioxidant and anticancer. Therefore, it was of interest to evaluate the effect of the consumption of the methanolic extract of the *P. indica* fruit. This work suggests that the fruit of *P. indica* presents antioxidant activity and that it can reduce the complications of DM caused in the lungs. To verify this, the effect of consumption of the methanolic extract of the fruit of *P. indica* in diabetic rats was evaluated when administered orally (VO) and nasally (VN) at a concentration of 25mg / kg of weight for 30 days. The content of phenolic acids and flavonoids was quantified and the antioxidant effect was evaluated *in vitro*. At the end of the treatment, the rats were sacrificed, the blood was collected for the quantification of the levels of glucose, lipids (cholesterol and triacylglycerides) and to determine the levels of lipoperoxidation in serum and the lung mitochondria were obtained to evaluate the activity of the complexes. Mitochondrial Respiratory, determine the levels of lipoperoxidation in lung mitochondria and the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The *in vitro* results showed a high content of phenolic acids and flavonoids and a high antioxidant activity. The *in vivo* results showed that it has no hypoglycemic and lipid-lowering effect when VO and VN are administered to diabetic rats. As for the activity of the mitochondrial respiratory complexes I, II, III and IV, it showed a tendency to improve its activity when VO and VN were administered. Regarding antioxidant activity, the extract had a significant effect in reducing lipoperoxidation in serum and lung mitochondria, and

showed a tendency to increase the activity of antioxidant enzymes SOD and GPx. In conclusion, it is considered that the VO and VN administration of the methanolic extract of the *P. indica* fruit does not control the hyperglycemia and neither improves the lipid profile, but reduces the oxidative damage caused by diabetes.

Key words: Diab tes mellitus, Medicinal plant, Biological activity, Oxidant stress, Antioxidant.

3. Introducción

3.1 Diabetes mellitus (DM)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2014 la prevalencia mundial de DM fue del 9% entre los adultos mayores de 18 años, lo que equivale a 422 millones de personas. En el 2012 se calculó que fallecieron 1.5 millones de personas como consecuencia directa de la DM. Más del 80% de las muertes por DM, se registra en países de ingresos bajos y medios y se estima que la DM será la séptima causa de mortalidad en 2030. En México, en el 2016, se identificaron 13.2 millones de adultos diagnosticados con DM lo que equivale al 10.4% de la población adulta (OMS, 2016).

La DM se describe como un trastorno metabólico de múltiples etiologías caracterizado por hiperglucemia crónica resultante de defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambos, lo que conduce a anormalidades en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. La hiperglucemia crónica se asocia con daño, disfunción e insuficiencia de los diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, corazón, vasos sanguíneos entre otros. Los síntomas de la hiperglucemia marcada incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, a veces con polifagia y visión borrosa; además, al deterioro del crecimiento y la susceptibilidad a ciertas infecciones (American Diabetes Association, 2014). Las causas de la DM son varias, incluidos los factores genéticos y ambientales. La secreción de insulina insuficiente puede ocurrir en asociación con la destrucción de las células β de los islotes pancreáticos o por disfunción dentro de las propias células β pancreáticas, disminución en el suministro de insulina y disminución de la sensibilidad a la insulina (Seino *et al.*, 2010).

3.1.1 Clasificación de la DM

- DM tipo 1: Representa sólo el 5-10% de las personas con DM, frecuente en jóvenes (American Diabetes Association, 2014). Es causada por la deficiencia de insulina debido a la destrucción de las células β pancreáticas principalmente a través de una reacción autoinmune, que a su vez se activa por diferentes factores que pueden ser

hereditarios (como el antígeno leucocitario humano (HLA)) o ambientales (Seino *et al.*, 2010). Los marcadores de la destrucción inmune de la célula β incluyen autoanticuerpos de células de los islotes, los autoanticuerpos a la insulina, autoanticuerpos frente a GAD (GAD65) y autoanticuerpos frente a las tirosinas fosfatasas IA-2 y IA-2B (American Diabetes Association, 2014).

- DM tipo 2: Representa 90-95% de las personas con diabetes, frecuente en adultos (American Diabetes Association, 2014). Se desarrolla en asociación con múltiples factores genéticos que conducen a una disminución de la secreción de insulina o resistencia a la insulina aumentada por los hábitos de estilo de vida, como comer en exceso (dieta especial rica en grasas), la falta de ejercicio y la obesidad resultante, como los factores ambientales y los resultados en la acción de la insulina insuficiente (Seino *et al.*, 2010).
- DM gestacional: Trastorno del metabolismo de la glucosa que se desarrolla durante el embarazo (Seino *et al.*, 2010) y que en la mayoría de los casos se resuelve después del embarazo. El incremento de mujeres con obesidad y DM en edad fértil, ha aumentado el número de mujeres embarazadas con DM tipo 2 no diagnosticadas. (American Diabetes Association, 2014).
- Otros tipos específicos de diabetes:
 - Defectos genéticos de las células β : se caracterizan frecuentemente por la aparición de hiperglucemia en una edad temprana (generalmente antes de la edad de 25 años) y alteración de la secreción de insulina con un mínimo o sin defectos en la acción de la insulina. Se hereda con un patrón autosómico dominante, la forma más común se asocia con mutaciones en el cromosoma 12 en un factor de transcripción hepática se hace referencia como factor nuclear de hepatocitos. Otra forma es la relacionada con mutaciones en el gen de la glucocinasa (GC) en el cromosoma 7p y repercute en una molécula de GC defectuosa. La GC convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato, a su vez, estimula la secreción de insulina por las células β (American Diabetes Association, 2014).
 - Defectos genéticos en la acción de la insulina: hay causas poco comunes de la DM que resultan de anomalías en la acción de la insulina determinadas genéticamente. Las anomalías metabólicas asociadas con mutaciones del receptor de la insulina

pueden variar a hiperinsulinemia o hiperglucemia modesta para la DM severa (American Diabetes Association, 2014).

- Enfermedades del páncreas exocrino: cualquier proceso que dañe de forma difusa el páncreas puede provocar DM. Procesos adquiridos incluyen pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía, y el carcinoma de páncreas. Con la excepción de la causada por el cáncer, pueden producir DM. La fibrosis quística y la hemocromatosis también pueden dañar las células β y afectar la secreción de insulina (American Diabetes Association, 2014).
- Endocrinopatías: varias hormonas (cortisol, glucagón, epinefrina), antagonizan la acción de insulina. Las cantidades excesivas de estas hormonas, produce acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, respectivamente, pueden causar diabetes. Esto ocurre generalmente en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina, hiperglucemia y típicamente se resuelve cuando el exceso de la hormona se ha resuelto (American Diabetes Association, 2014).
- Fármacos y químicos inducen DM: muchos medicamentos pueden dañar la secreción de insulina. Estos medicamentos no pueden causar la diabetes por sí mismas, pero que pueden desencadenar la diabetes en individuos con resistencia a la insulina. Ciertas toxinas tales como Vacor (un veneno para ratas) y pentamidina intravenosa pueden destruir permanentemente células β pancreáticas, tales reacciones a fármacos son raras. También hay muchos fármacos y hormonas que pueden afectar la acción de la insulina como el ácido nicotínico y los glucocorticoides (American Diabetes Association, 2014).

3.2 Complicaciones de la DM

Las complicaciones de la DM se clasifican en macrovasculares y microvasculares, y se presentan en la mayoría de las personas afectadas por la DM tipo 1 y tipo 2.

3.2.1 Complicaciones macrovasculares

Entre las complicaciones macrovasculares que presentan las personas afectadas por la DM se encuentran la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad arterial periférica y el accidente cerebrovascular. En los pacientes diabéticos se incrementa considerablemente la viscosidad del plasma y se cree que promueven la formación de arteriosclerosis y trombosis en los vasos sanguíneos además del acompañamiento de dislipidemias asociadas a enfermedades cardiovasculares (Goutos *et al.*, 2015).

3.2.1.1 Arterioesclerosis

Es una enfermedad que afecta inicialmente a la túnica íntima de las arterias de distribución, con daño endotelial e inflamación y que se caracteriza por depósitos de lípidos y proliferación de tejido fibroso, con capacidad para la obstrucción de la luz del vaso, ya sea por crecimiento de la placa o por ruptura y trombosis (Forbes y Cooper, 2013). Es más frecuente en los pacientes que cursan DM con factores subyacentes que contribuyen con anomalías relacionadas en la pared del vaso, las células o factores circulantes y el flujo sanguíneo. En la pared del vaso hay un aumento de la glucosilación no enzimática de las lipoproteínas, lo que conduce a la acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos; las lipoproteínas modificadas provocan la formación de autoanticuerpos y complejos autoinmunes, los cuales activan el endotelio y células de músculo liso contribuyendo a la formación de placas de ateroma acelerado (Goutos *et al.*, 2015). En el caso de las células circulantes, las plaquetas, se caracterizan por ser deformes y la reducción en la adhesión y agregación. Además, los eritrocitos son más propensos a estrés oxidante el cual contribuye a la reducción de la vida celular y su disminución de la afinidad por el oxígeno limitando así el suministro de oxígeno a los tejidos (Goutos *et al.*, 2015).

3.2.1.2 Dislipidemias

Es la alteración de la concentración normal de lípidos en la sangre, principalmente colesterol y triacilglicéridos. Esto incrementa el riesgo de la enfermedad cardiovascular como principal causa de mortalidad y de lesión orgánica funcional en el páncreas y otros

órganos. En la dislipidemia diabética se encuentran niveles elevados de triacilglicéridos (TAG) con valores mayores de 150 mg/dL en plasma, baja concentración de colesterol en lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) con valores menores de 40 mg/dL, aumento de partículas de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y excesiva lipemia postprandial (Taskinen, 2003). Esto se debe a la alteración del metabolismo de los lípidos causado por la deficiencia de insulina que provoca un déficit de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), por lo que disminuye la hidrólisis de TAG de los quilomicrones y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), por lo tanto, no hay liberación de éstos hacia el tejido muscular y adiposo. Además, se aumenta la lipólisis en los adipocitos y produce una elevación de los niveles de TAG séricos, trayendo como consecuencia una disminución de los niveles del colesterol HDL (C-HDL) (Maldonado *et al.*, 2012).

3.2.2 Complicaciones microvasculares

Las complicaciones microvasculares diabéticas son causadas por la exposición prolongada a altos niveles de glucosa (Goutos *et al.*, 2015). El grado de daño a los tejidos diabéticos también está influenciado por determinantes genéticos de susceptibilidad individual y, como con la arteriosclerosis, por la presencia de los factores de aceleración independientes, tales como la hipertensión y la dislipidemia (Giacco y Brownlee, 2010). Las complicaciones microvasculares más frecuentes que se presentan en las personas con DM son la nefropatía, la retinopatía, la neuropatía periférica y la microangiopatía pulmonar.

3.2.2.1 Nefropatía diabética

Es una de las complicaciones microvasculares más severas y la principal causa de falla renal terminal. Se caracteriza por el desarrollo de proteinuria con una subsiguiente disminución de la tasa de filtración glomerular y evoluciona durante un largo período de tiempo. Presenta alteraciones hemodinámicas, como el aumento en la tasa de filtración glomerular debido al incrementado flujo de plasma y la presión capilar glomerular, así como la hiperplasia e hipertrofia (Forbes y Cooper, 2013).

3.2.2.2 Retinopatía diabética

Se caracteriza por un espectro de lesiones en la retina y es la principal causa de ceguera entre los adultos de 20-74 años. Hay cambios en la permeabilidad vascular, microaneurismas capilares, degeneración capilar, y la formación excesiva de nuevos vasos sanguíneos (neo vascularización). La retina neural también es disfuncional con la muerte de algunas células, lo que altera la electrofisiología de la retina y resulta en una incapacidad para discriminar entre colores. Clínicamente, la retinopatía diabética se separa en fases de la enfermedad no proliferativas y proliferativas. En las primeras etapas, la hiperglucemia puede conducir a la muerte de pericitos intramurales y engrosamiento de la membrana basal, que contribuyen a los cambios en la integridad de los vasos sanguíneos en la retina, la alteración de la barrera hemato retiniana y la permeabilidad vascular. La retinopatía diabética se desarrolla durante muchos años, y casi todos los pacientes con diabetes tipo 1 y la mayoría de la DM tipo 2, presentan algunas lesiones en la retina después de 20 años de enfermedad. Por otra parte, mientras que en la diabetes tipo 1 la principal amenaza de la visión de la retina parece ser la retinopatía proliferativa, en la DM tipo 2 existe una mayor incidencia de edema macular (Forbes y Cooper, 2013).

3.2.2.3 Neuropatía diabética

Es un síndrome que abarca tanto las divisiones somáticas y autonómicas del sistema nervioso periférico. Se ha reconocido que el daño a la médula espinal y el sistema nervioso central superior también puede ocurrir y que la neuropatía es un factor importante en la alteración de la cicatrización de heridas, disfunción eréctil y disfunción cardiovascular vistos en la DM. Clínicamente se caracteriza por el desarrollo de anomalías vasculares, tales como engrosamiento de la membrana basal de los capilares y la hiperplasia endotelial con disminución posterior en la tensión de oxígeno y la hipoxia. La neuropatía avanzada, debido al deterioro de las fibras nerviosas, se caracteriza por alteraciones de la sensibilidad a las vibraciones, umbrales térmicos y progresa a la pérdida de percepción sensorial (Forbes y Cooper, 2013).

3.2.2.4 Microangiopatía pulmonar diabética

La microangiopatía pulmonar diabética se desencadena por la hiperglucemia y el estrés oxidante presentes en la DM. Se caracteriza por un engrosamiento de las paredes alveolares debido al aumento en el colágeno, elastina, y engrosamiento de la lámina basal, lo que conduce a una reducción en la elasticidad del tejido pulmonar, además de un engrosamiento de la lámina basal capilar (la proliferación de fibroblastos) y aumento de la densidad de microvasos endoteliales acompañado de una inflamación crónica de bajo grado y la neuropatía autonómica involucrada con los músculos respiratorios, provocando una insuficiencia pulmonar (Klein *et al.*, 2010).

3.3 Pulmón y la DM

3.3.1 Pulmón

Los pulmones son un par de órganos de forma cónica que ocupan la mayor parte de la cavidad torácica, los cuales tienen la función de llevar a cabo el intercambio de gases entre la atmósfera y la sangre, la regulación del equilibrio ácido-base, la protección frente a patógenos, la desintoxicación y funciones metabólicas diversas, como las relacionadas con el metabolismo lipídico, la síntesis de *novo* de ácidos grasos y la oxidación, la esterificación de lípidos, la hidrólisis de enlaces ácido-éster, la hidrólisis de lipoproteínas, la síntesis de fosfatidilcolina, la síntesis y secreción de prostaglandinas (Alvarado y Arce, 2016). En los adultos, el peso del pulmón representa alrededor del 1.5% del peso corporal (1 kg en un adulto de 70 kg), el tejido pulmonar supone el 60% de ese peso y la sangre que contiene, ocupa el resto. Los pulmones están divididos en lóbulos. El pulmón derecho tiene tres lóbulos: superior, medio e inferior y el izquierdo dos: medio e inferior. Además, están constituidos por el árbol bronquial y el árbol vascular, ambos están rodeados de tejido conjuntivo elástico. La parte superior del pulmón se llama vértice, se eleva en la base del cuello, unos 2.5 cm por encima de la clavícula, la parte inferior se llama base, es cóncava y

está en contacto con la cara superior del diafragma. En la cara mediastínica de cada pulmón se encuentra un orificio (hilio) por donde penetran los bronquios, las arterias y las venas pulmonares. Las siguientes divisiones de los bronquiolos terminales dan lugar a la zona respiratoria, donde se lleva a cabo el intercambio de gases. La unidad respiratoria terminal está formada por el bronquiolo respiratorio, el conducto alveolar, el saco alveolar y los alveolos, los vasos arteriales y venosos que perfunden y drenan la sangre de esa zona. Los elementos básicos de la unidad respiratoria terminal son los alveolos, que en el pulmón humano existen 300 millones. Los alveolos están formados por una única y delgada capa de células epiteliales llamadas neumocitos. Hay dos tipos de neumocitos: los de tipo 1 o epiteliales que son muy aplanados y los gases difunden rápidamente a través de ellos. Los de tipo 2 o granulares, encargados de sintetizar el surfactante pulmonar, el cual se mezcla con la película de líquido que tapiza a los alveolos permitiendo la expansión de los pulmones durante la respiración y confiere estabilidad a la estructura de los alveolos. Otro tipo de células encontradas en la superficie epitelial son los macrófagos alveolares que protegen a los pulmones frente a patógenos u otras partículas extrañas que se depositen en el interior de estos. La circulación pulmonar se inicia en la arteria pulmonar que transporta sangre pobre de oxígeno procedente del ventrículo derecho, esta arteria se bifurca en dos ramas, derecha e izquierda, que se dirigen a cada pulmón y se ramifican siguiendo el árbol bronquial hasta formar capilares muy finos que cubre el 80-90% de la superficie alveolar, donde se oxigena la sangre (Fig. 1). Ya oxigenada la sangre retorna al ventrículo izquierdo a través de las venas pulmonares (Gal y Lopez, 2007).

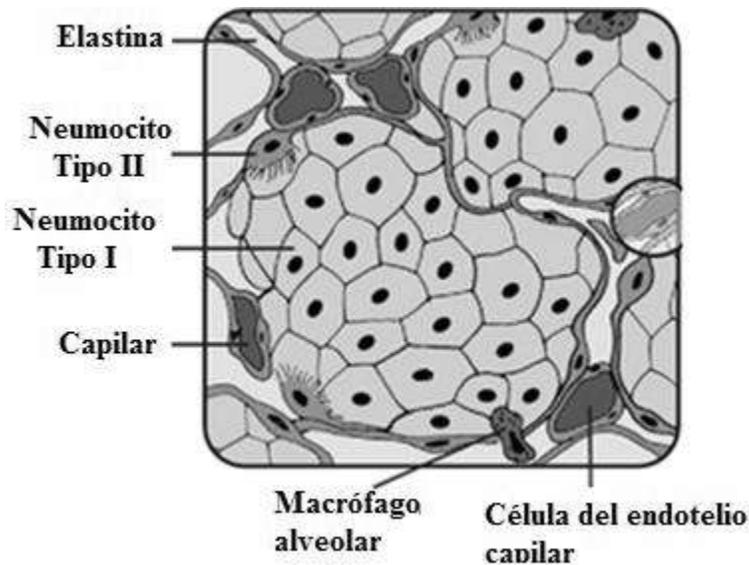


Figura 1. Estructura de los alveolos. Tomada de Gal y Lopez (2007).

Cada pulmón está contenido en un saco de doble pared denominado pleura. La pleura es una membrana serosa compuesta por dos hojas: hoja visceral, íntimamente unida a la superficie del pulmón y la hoja parietal, adherida a las paredes del tórax y a la cara superior del diafragma. Estas hojas o membranas están formadas por un mesotelio con microvellosidades situado sobre una membrana basal que descansa sobre varias capas de tejido conjuntivo elástico y numerosos capilares. Entre ambas hojas se encuentra el líquido pleural, actúa como lubricante para que los pulmones puedan deslizarse sobre la pared torácica y mantenerlos unidos a ésta (Gal y Lopez, 2007).

3.3.2 Transportadores de glucosa

El epitelio pulmonar cuenta con distintos transportadores de glucosa, debido a que las células pulmonares prefieren la oxidación glucosa para llevar a cabo sus funciones metabólicas y fisiológicas (Kalsi *et al.*, 2008). La glucosa, de manera general, se transfiere a través de las membranas celulares y las barreras de tejido por un proceso de transporte saturable específico que involucra a miembros de dos clases diferentes de transportadores de glucosa, transportadores de glucosa independientes de sodio (transporte facilitado; GLUT) y los transportadores de glucosa dependientes de sodio (transporte activo; SGLT).

Cada uno con diferentes propiedades cinéticas. La mayoría de las células expresan una variedad de transportadores de glucosa y el patrón de expresión en diferentes tejidos se relaciona con las necesidades metabólicas específicas (Shah *et al.*, 2012). Todos los transportadores de membrana que median la transferencia de solutos desde el espacio extracelular hacia el citosol (o viceversa) comparten varias características: a) Especificidad: en general, cada transportador es específico para una sola sustancia o un grupo muy emparentado de éstas. b) Saturación: la capacidad de transporte puede alcanzar un máximo cuando todos los sitios de unión para el soluto a transportar están ocupados y c) Competición: ocurre cuando más de una sustancia es capaz de ser transportada por el sistema transportador, la que se encuentre en mayor concentración, será preferentemente transportada (Bermúdez *et al.*, 2007).

3.3.2.1 Transportadores de glucosa en pulmón

La captación de glucosa por las células pulmonares se estudió en 1981 por Kerr *et al.*, usando análogos no metabolizables, la 2-desoxiglucosa y la 3-O-metil-glucosa. Ambos compuestos son transportados por difusión facilitada. Además, fueron recuperados del tejido pulmonar cuando se añadieron al líquido de perfusión de pulmones aislados de ratas. En 1988, Basset *et al.*, usaron el alfa-metilglucósido, que es transportado por difusión activa dependiente de sodio. Obtuvieron como resultado una acumulación en el tejido pulmonar, lo que sugirió la presencia de transporte activo en algún lugar del pulmón. Para demostrar la presencia de transporte activo, se usó un inhibidor específico para SGLT y se obtuvo una disminución en la depuración del alfa-metilglucósido. Además, se localizó la acumulación del alfa-metilglucósido en el revestimiento de la capa de lumen en las células de la tráquea de rata y oveja. Estos experimentos sugirieron que las células epiteliales de los espacios alveolares y las vías respiratorias poseen transportadores SGLT (Prost y Saumon, 2007). Existen estos transportadores independientes de insulina Glut2 y Glut10 en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales del pulmón, también se encuentran presentes en las células epiteliales de biopsias bronquiales en humanos (Kalsi *et al.*, 2008). La presencia de estos transportadores hace inferir que los elevados niveles de glucosa presentes en la DM favorecen la disfunción pulmonar, a través de la glucosilación de

proteínas, la inflamación y el estrés oxidante, debido a que exhibe una captación de glucosa independiente de insulina.

3.3.3 Complicaciones pulmonares causadas por DM

Hay cada vez más pruebas que muestran que los pulmones son también uno de los órganos blanco para la microangiopatía diabética en pacientes con DM tipo 1 o tipo 2 (Hong *et al.*, 2016), debido a la gran red capilar alveolar pulmonar, que es una unidad microvascular grande y que puede verse afectada por la microangiopatía, teniendo en cuenta el impacto de la DM en la retinopatía y la nefropatía. La hiperglucemia crónica conduce a la glucosilación de proteínas de suero y de tejidos y a la formación de productos finales de glucosilación avanzada. Después de su deposición en los tejidos, las proteínas glucosiladas tienen efectos proinflamatorios (Klein *et al.*, 2010). Además, la hiperglucemia produce el aumento de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 y IL-18, promoviendo el estado procoagulante y el aumento de moléculas de adhesión de leucocitos (Honiden y Gong, 2009), lo que lleva a complicaciones microangiopáticas y a la dislipidemia diabética.

La enfermedad pulmonar asociada con la DM, incluye una predisposición a las infecciones y a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica como la neumonía, el asma, la fibrosis pulmonar y la tuberculosis pulmonar, así como sufrir alteraciones en la respiración durante el sueño. Además, se ha informado que la incidencia de muerte debido a enfermedades pulmonares en los pacientes diabéticos japoneses es 50% mayor (Hong *et al.*, 2016). En México, en el 2012 se reportó una incidencia de tuberculosis de 23 por cada 100,000 habitantes y se concluyó que más del 10% de los pacientes infectados con tuberculosis padecía DM; además el riesgo de las complicaciones se triplica en comparación con un paciente normoglucémico (Delgado-Sánchez *et al.*, 2015).

Cuando se compara con sujetos sanos, los pacientes con DM tipo 1 o tipo 2, tienen un mayor riesgo de infecciones de las vías respiratorias y el riesgo aumenta con la aparición repetida de las infecciones comunes. Además, de que estos pacientes tienen una disminución significativa en muchos parámetros como reducción de la capacidad vital, el flujo espiratorio medio, el volumen residual de la respiración, la capacidad pulmonar total

(TLC), la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen respiratorio forzado en un segundo (FEV1) (Hong *et al.*, 2016). Los estudios que evalúan la fisiopatología de la insuficiencia pulmonar en la DM, identificaron varios mecanismos potenciales: la microangiopatía de los capilares alveolares y arteriolas pulmonares, la inflamación crónica de bajo grado y la neuropatía autonómica que involucra los músculos respiratorios, también la pérdida de retroceso elástico secundario y la glucosilación de colágeno del parénquima pulmonar y la hipoxia (Klein *et al.* 2010). Además, el estrés oxidante, la glucosilación no enzimática de proteínas y la vía de los polioles (Hong *et al.*, 2016). Las especies reactivas del oxígeno (ERO) y las especies reactivas del nitrógeno (ERN), no pueden ser neutralizadas por los antioxidantes, dañan ácidos nucleicos, lípidos y proteínas del pulmón y hay evidencia de que la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) disminuye en pulmón, mientras que el contenido de óxido nítrico (NO) y malondialdehído (MDA), se incrementaron significativamente. El NO y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pueden reaccionar simultáneamente para producir peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), el cual es perjudicial. La presencia de altas concentraciones de NO en el pulmón diabético, sugiere que la producción de peroxinitrito está relacionada con el daño al pulmón. Además, la glucosilación no enzimática es acelerada por el estrés oxidante, lo que conlleva a un grupo heterogéneo de proteínas modificadas, lípidos y ácidos nucleicos derivados de la hiperglucemia intracelular a través de una reacción no enzimática, la de Maillard, la cual puede presentar cambios en las propiedades celulares de los tejidos repercutiendo en las funciones biológicas de las proteínas del pulmón (Hong *et al.*, 2016).

3.4 La DM y el estrés oxidante

La hiperglucemia estimula la generación de ERO a través de diferentes fuentes, tales como la fosforilación oxidativa, auto-oxidación de la glucosa, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido oxidasa (NOX), la vía de los polioles, entre otras. La generación del $O_2^{\cdot-}$ por las mitocondrias disfuncionales en la DM, se ha postulado, como el evento iniciador primario en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Dentro de las mitocondrias, más del 90% de oxígeno en los seres humanos, se metaboliza durante la

fosforilación oxidativa, los metabolitos de la glucosa y otros combustibles que donan electrones para reducir el oxígeno molecular, dando como resultado la generación de adenosín trifosfato (ATP). A pesar de ser un proceso altamente regulado, del 2-4% del oxígeno, se reduce sólo parcialmente a O_2^- , en lugar de totalmente a agua por las enzimas antioxidantes residentes en condiciones fisiológicas. Hay dos sitios principales en donde una fuga de electrones puede ocurrir para producir O_2^- dentro de las mitocondrias, en la NADH deshidrogenasa (complejo I) y en la interfaz entre la coenzima Q (CoQ) y complejo III. Por lo tanto, en base a estudios *in vitro*, se ha planteado la hipótesis de que el exceso de producción de O_2^- es a través del colapso prematuro de la potencial de membrana mitocondrial de modo que la fuga de electrones va a formar O_2^- y posteriormente peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en lugar de la producción de ATP. Además, se ha reportado que las ERO liberadas por la mitocondria afectan muchos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos dando lugar al estrés oxidante (Forbes y Cooper, 2013). Las ERO oxidan y alteran la estructura y función de las proteínas, lípidos y el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Soriano, 2013). Algunos tejidos susceptibles al daño por las ERO, son el tejido nervioso, cardíaco, hepático, renal y pulmonar (Ptilovanciv *et al.*, 2013), debido a que exhiben la captación de glucosa independiente de insulina (Karim *et al.*, 2012).

3.4.1 Lipoperoxidación en la DM

La lipoperoxidación es una consecuencia natural de los procesos metabólicos en la célula, que ocurre en plantas y animales. La peroxidación de lípidos involucra reacciones de iniciación, propagación y término. El estrés oxidante es responsable de la peroxidación de lípidos y se inicia cuando una especie reactiva generalmente el radical hidroxilo (OH^-), toma un hidrógeno de las cadenas de acilo de un ácido graso poliinsaturado de los fosfolípidos y triacilglicéridos (TAG) de las membranas celulares o de las lipoproteínas, formando así un radical lipídico (Saldaña-Balmori *et al.*, 2003). En la DM, la elevada generación del O_2^- por las mitocondrias disfuncionales, conduce a una elevación del H_2O_2 a través de la acción de la enzima Mn-SOD. En presencia de hierro ferroso, el H_2O_2 se somete a la química de Fenton para producir radicales OH^- (Fig. 2). El radical OH^- es muy

reactivo y toma rápidamente los átomos de hidrógeno de las biomoléculas en su entorno inmediato. Los fosfolípidos y los TAG de la membrana son objetivos principales para el ataque mediado por OH^\cdot , generando radicales lipídicos. Dichos radicales lipídicos se oxidan rápidamente, lo que conduce a la peroxidación lipídica de las cadenas de acilo. Después de la peroxidación, los fosfolípidos de la membrana sufren una reorganización de los enlaces, que permite una mayor captura de radicales y la propagación de la cadena. Las cadenas de acilo peroxidado se someten subsiguientemente a escisión no enzimática de Hock, produciendo una familia de aldehídos de diversas longitudes de carbono (MDA, hidroxi hexenal e hidroxi nonenal), dependiendo del nivel de insaturación y de las especies de lípidos oxidadas. De manera importante, el segundo producto de la escisión de Hock, el fosfolípido o TAG original, ahora contiene una cadena de acilo acortada que afecta el empaquetamiento, organización y arquitectura de los lípidos y la permeabilidad de la membrana. Esto puede conducir a una actividad enzimática alterada de los complejos unidos a la membrana (Haunk y Bernlohr, 2017).

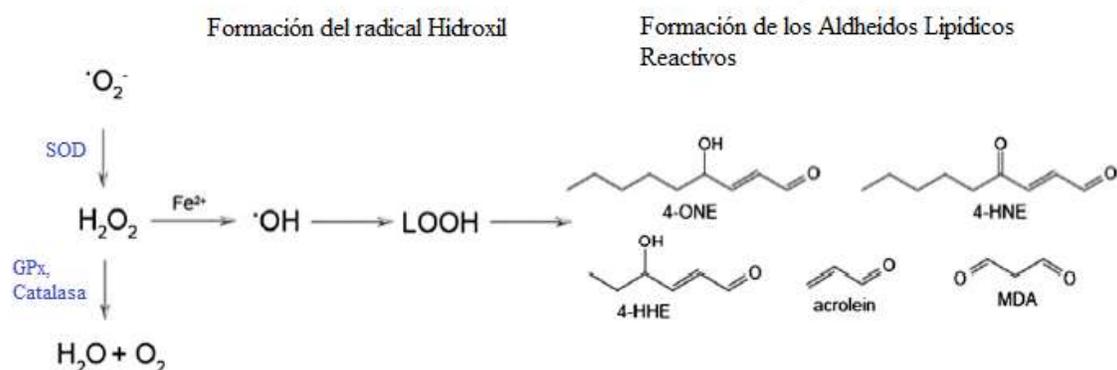


Figura 2. Generación de aldehídos lipídicos reactivos. Se representan a los aldehídos lipídicos más comunes: 4-oxononal (4-ONE), 4-hidroxi nonenal (4-HNE), 4-hidroxi hexenal (4-HHE) y malondialdehído (MDA). Tomada y modificada de Haunk y Bernlohr (2017).

3.5 Antioxidantes

Para equilibrar la respuesta oxidante, el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL, como el $\text{O}_2^{\cdot -}$, el radical OH^\cdot , el NO, entre otros, y son eficaces en la prevención de la diabetes inducida experimentalmente en

modelos animales (Ptilovanciv *et al.*, 2013). Los antioxidantes son moléculas que retardan o previenen la oxidación de lípidos, proteínas y el DNA. Los antioxidantes se dividen en enzimáticos: SOD, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa y la catalasa y no enzimáticos: vitamina E, vitamina C, betacaroteno y el licopeno (Forbes y Cooper, 2013). Los antioxidantes no enzimáticos al reaccionar con un RL le ceden un electrón y se oxidan, transformándose así en un RL débil no tóxico y que, en algunos casos, como la vitamina E, puede generarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Por ejemplo, la vitamina E, el beta caroteno y el licopeno neutralizan y capturan el $O_2^{\cdot-}$, captura radicales hidroxilos y neutraliza peróxidos. La vitamina C neutraliza el $O_2^{\cdot-}$, captura radicales hidroxilos, anión peróxido y regenera la forma oxidada de vitamina E. Los enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL al disminuir o reducir su toxicidad (Ramos *et al.*, 2006). Por ejemplo, la SOD cataliza la reducción de superóxido a H_2O_2 y el GPx convierte el H_2O_2 en agua (Forbes y Cooper, 2013). Se ha demostrado que estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica (Ramos *et al.*, 2006).

3.6 Metabolitos secundarios de plantas y sus propiedades antioxidantes

Las plantas producen una amplia y diversa gama de compuestos orgánicos que parecen no tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios (MS). Los MS no tienen roles directos en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o la formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los MS también difieren de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, hidratos de carbono, lípidos de acilo), al tener una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, los MS particulares a menudo se encuentran en una sola especie de planta o grupo relacionado de especies, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal. Los MS de las plantas se pueden dividir en tres grupos químicamente

distintos, los terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2002).

3.6.1 Terpenos

Constituyen el grupo más numeroso de MS (más de 40,000 moléculas diferentes). La biosíntesis es a partir de acetil-CoA o intermediarios glucolíticos. Son insolubles en agua y se derivan de la unión de elementos de cinco carbonos que tienen el esqueleto de carbono ramificado de isopentano. Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (5 átomos de carbonos (AC)) que contienen: los terpenos de 10 AC contienen dos unidades de isopreno y se llaman monoterpenos; los de 15 AC tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 AC tienen cuatro unidades de isopreno y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 AC, los tetraterpenos tienen 40 AC y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Taiz y Zeiger, 2002). Los terpenos se sintetizan a partir de metabolitos primarios en al menos dos formas diferentes: en la vía del ácido mevalónico, tres moléculas de acetil-CoA se unen paso a paso para formar ácido mevalónico. Este intermediario clave de seis carbonos se pirofosforila, descarboxila y deshidrata para producir isopentenil pirofosfato (IPP2). IPP2 es el bloque de construcción de terpenos activado de cinco carbonos (Taiz y Zeiger, 2002). Recientemente, se descubrió que el IPP2 también puede formarse a partir de intermediarios de glucólisis o el ciclo de reducción de carbono fotosintético a través de un conjunto separado de reacciones llamado ruta del metilentriol fosfato que funciona en cloroplastos y otros plastidios. Este grupo está compuesto por hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardíacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Asimismo, presentan diversas actividades terapéuticas, por ejemplo, algunos terpenos como los iridoides tienen propiedades antiinflamatoria, antimicrobiana y amebicida. Por otro lado, las saponinas, presentan actividades anticancerígenas, hipocolesterolemia y antiinflamatoria. Los carotenoides tienen propiedades antioxidantes, previenen la degeneración macular y enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, los esteroides

presentan actividad hipocolesterolemia y previenen las enfermedades cardiovasculares (López-Carreras *et al.*, 2012).

3.6.2 Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de MS que contiene un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, compuesto por un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los fenólicos vegetales son un grupo químicamente heterogéneo de casi 10,000 compuestos individuales, algunos son solubles solo en solventes orgánicos y otros son polímeros grandes e insolubles (Taiz y Zeiger, 2002). Están conformados por ácidos fenólicos (poseen una subunidad fenólica), flavonoides (poseen dos subunidades fenólicas), taninos (poseen tres o más subunidades fenólicas) entre otros (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013). Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico (Taiz y Zeiger, 2002). La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de la eritrosa-4-P y del ácido fosfoenolpirúvico, se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis del ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Además, presentan diversos efectos terapéuticos, por ejemplo, los taninos, antocianinas y flavonoides presentan actividad antioxidante que se debe principalmente a la reactividad de su grupo fenol (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013). Asimismo, las isoflavonas presentan actividad hipocolesterolemia y previenen enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, las catequinas tienen propiedades antiagregantes, antiinflamatorias, antiulcéricas y antivirales (López-Carreras, *et al.*, 2012).

3.6.3 Compuestos que contienen nitrógeno

Una gran variedad de MS de plantas contiene nitrógeno en su estructura. Se incluyen a los alcaloides y glucósidos cianogénicos, algunos miembros de este grupo son tóxicos para los seres humanos y otros presentan efectos terapéuticos. La mayoría de los MS nitrogenados se biosintetizan a partir de aminoácidos comunes (Taiz y Zeiger, 2002).

3.6.3.1 Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 MS que tienen en común las siguientes características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). La mayoría de estos MS son alcalinos, presentando valores de pH de 7.2 en el citosol y en la vacuola un pH alrededor de 5 a 6. El átomo de nitrógeno está protonado, por lo tanto, los alcaloides tienen carga positiva y generalmente son solubles en agua (Taiz y Zeiger, 2002). En los seres humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas debido a la interacción con los neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos. Se sintetizan a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

3.6.3.2 Glucósidos

Los glucósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de glucosa se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glucósidos:

- **Saponinas:** se conocen como glucósidos esteroideos, glucósidos esteroideos alcaloides o glucósidos triterpenos. Por lo tanto, son triterpenoides o esteroides que presentan una o más moléculas de glucosa en su estructura. Se pueden presentar como agluconas, es decir, sin la glucosa (terpeno sin la glucosa), se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (glucosa) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Ávalos y Pérez-Urria 2009).
- **Glucósidos cardiacos:** son semejantes a las saponinas esteroideas, presentan propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glucósidos o de agluconas. Un miembro importante de este grupo es la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como tratamiento para la insuficiencia cardiaca congestiva (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).
- **Glucósidos cianogénicos:** son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es dañada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno. Un ejemplo es la amigdalina que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón (Ávalos y Pérez-Urria 2009).

3.7 Uso de plantas medicinales en el tratamiento de la DM

En países como China, India y Tailandia se han producido avances significativos en la integración de la medicina tradicional en modelos de salud, debido a los efectos terapéuticos de las plantas medicinales atribuidos a sus MS (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013). Por otro lado, en México a partir de la última década se han iniciado investigaciones para evaluar el efecto terapéutico de plantas medicinales endémicas, lo que indica la importancia de la medicina tradicional mexicana. Además, hay un gran número de reportes acerca de plantas medicinales usadas en la fitoterapia para el tratamiento de la DM con efectos hipoglucemiantes, hipolipidémicos y antioxidantes, algunas de estas son: *Psacalium decompositum*, *Columbrina elliptica*, *Agarista mexicana* (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013), *Turnera diffusa*, entre otras. Moo-Huchin *et al.* (2015), en México, cuantificaron el

contenido de fenoles y flavonoides y determinaron la actividad antioxidante *in vitro* de tres frutas de Yucatán (*Chrysophyllum cainito* L., *Anacardium occidentale* y *Anacardium occidentale*), se concluyó que las tres frutas presentaron actividad antioxidante (Cuadro 1). En la India se realizó una investigación para analizar el efecto hipolipidémico de la especie *Cuminum cyminum*, utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la dispepsia, diarrea e ictericia. Con resultados de que *C. cyminum* reducía significativamente el colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos libres y TAG en plasma y en tejido (Dhandapani *et al.*, 2002). En los Estados Unidos de América se evaluó la actividad hipoglucémica de las antocianinas presentes en *Vaccinium angustifolium* Aiton usando labrasol como vehículo para aumentar la biodisponibilidad de los extractos, el tratamiento con malvidin-3-O-glucósido mostró un efecto hipoglucémico mientras que el tratamiento con delphinidina-3-O-glucósido no lo presentó (Grace *et al.*, 2009). Otro trabajo en China, investigó los efectos antioxidantes, hipoglucemiantes y hipolipidémicos de los flavonoides y triterpenoides presentes en *Potentilla discolor* Bunge, utilizada tradicionalmente en China para el tratamiento de la DM. Se obtuvo como resultado que *P. discolor* Bunge redujo los niveles de colesterol, TAG, disminuyó los niveles de MDA, del NO y de la glucosa (Zhang *et al.*, 2010). Mientras que en Amán Jordania, se realizó un estudio para determinar la actividad hipoglucémica de un grupo de plantas usadas en la medicina tradicional: *Eringyium creticum*, *Geranium graveolens*, *Paronychia argentea* y *Vartemia iphionoides*. Los resultados con los extractos acuosos de *G. graveolens* y *V. iphionoides* presentaron gran actividad hipoglucémica, mientras que *E. creticum* exhibió poca actividad y *P. aregntea* presentó actividad nula (Kasabri, *et al.*, 2011). Qiao *et al.*, en China (2011), aislaron a la trans-tilirosida del extracto metanólico de *Potentilla chinensis* para medir las propiedades hipoglucemiantes, hipolipemiantes y antioxidantes en ratas diabéticas. Se obtuvo como resultado que este compuesto reduce los niveles de colesterol, TAG, glucosa y presenta actividad antioxidante. Otro estudio realizado en la India evaluó el efecto antioxidante del extracto metanólico de la raíz de *Potentilla fulgens* (utilizada tradicionalmente como un remedio popular por los profesionales de la salud locales de Khasi Hills) en ratas diabéticas, se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 250 mg/kg peso. Con resultados de que se redujo el estrés oxidante en riñón e hígado (Saio *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en frutas de Yucatán

Fruta		Ácidos fenólicos totales (mg de ácido gálico/mg de fruto)	Flavonoides totales (mg de quercetina/mg de fruto)	Referencia
Manzana estrella púrpura (<i>Chrysophyllum cainito</i> L.)		6.95±0.47	8.44±0.31	Moo-Huchin <i>et al.</i> , 2015
Anacardo amarillo (<i>Anacardium occidentale</i>)		6.33±0.22	6.28±0.33	Moo-Huchin <i>et al.</i> , 2015
Anacardo rojo (<i>Anacardium occidentale</i>)		13.17±0.46	8.34±0-43	Moo-Huchin <i>et al.</i> , 2015

3.7.1 *Potentilla indica* o *Duchesnea indica*

La *P. indica*, comúnmente conocida como la fresa de la India, pertenece a la familia de las rosáceas, se encuentra ampliamente distribuida en Asia, Europa y América, es una planta herbácea perenne de 10 cm de altura, el follaje es semicaducifolio con flores amarillas y sus frutos son rojos y se parecen a las fresas (Fig. 3) (Plants DB, 2016). Se ha utilizado como una medicina herbal tradicional en Asia desde hace miles de años, principalmente para el tratamiento de la lepra, fiebre congénita, la inflamación del tejido, hematemesis, hipoglucemiantes y el cáncer, entre otros usos. Hoy en día, se usa clínicamente para el tratamiento del cáncer solo o como un ingrediente principal en las fórmulas de la medicina herbal china para el tratamiento de cánceres, especialmente de cánceres ginecológicos. Varios compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos, ácidos elálgico y flavonoides, se han aislado de género *Duchesnea*, y otros estudios farmacológicos han demostrado que los compuestos fenólicos son los principales ingredientes activos (Zhu *et al.*, 2015). El ácido

elálgico exhibe propiedades antioxidantes tanto *in vivo* e *in vitro*, de hecho, se ha demostrado que ejercen una acción de barrido potente tanto en el $O_2^{\cdot-}$ y OH^{\cdot} , así como la peroxidación de lípidos. En un estudio se administró que el ácido elálgico vía oral en una concentración de 10 mg/kg a ratas, redujo el estrés oxidante en hígado y corazón (Yüce *et al.*, 2007). En otro estudio, los extractos fenólicos de *P. indica* inhibieron el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de cáncer de cuello uterino a través de la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular. Además, presenta otras actividades biológicas, incluyendo antioxidante, inmunomodulador, antiinflamatorio (Zhu *et al.*, 2015), antibióticas (Hu *et al.*, 2009). En el año del 2009 en el fruto de *P. Indica*, se realizó una extracción e identificación de las antocianinas por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con detección de matriz de fotiodos y espectrometría de masas (EM), y se identificaron tres antocianinas: cianidina 3-O-rutinósido (61%), peonidina 3-O-rutinósido (34%), y petunidina 3-O-rutinósido (5%) (Fig. 4) (Qin *et al.*, 2009). En otro estudio que se realizó en el año del 2015, se analizaron los compuestos fenólicos del extracto crudo de *P. indica* por HPLC-ESI-MS / MS y ESI-IT-MS (trampa de iones MS) y se identificaron un total de 27 compuestos fenólicos que abarcan cuatro grupos fenólicos, incluyendo elagitaninos, ácido elálgico y glucósidos de ácido elálgico, ácido hidroxibenzóico y derivados del ácido hidroxicinámico, y flavonoles (Zhu *et al.*, 2015).



Figura 3. Planta de *P. indica*. Tomada de Plants DB (2016).

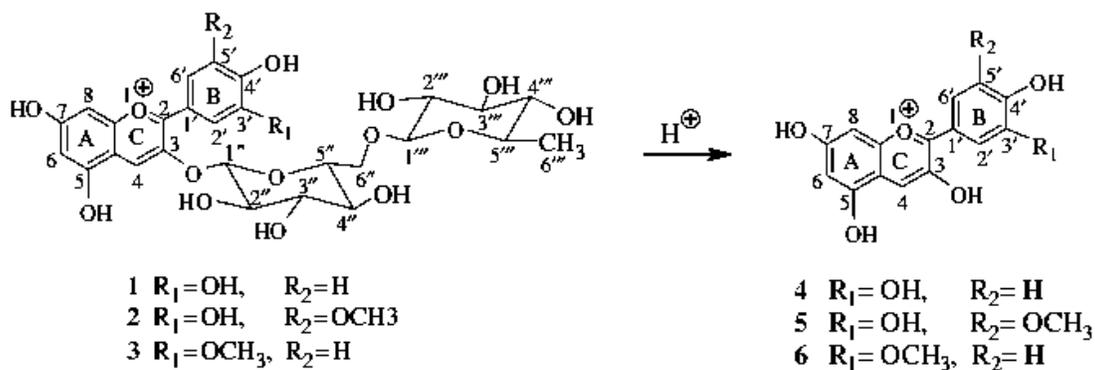


Figura 4. Las estructuras químicas de las antocianinas identificadas en el fruto de *P. indica* y sus agliconas después de la hidrólisis ácida: 1, cianidina 3-O-rutinósido (Cy-3-Rut); 2, petunidina 3-O-rutinósido (Pt-3-Rut); 3, peonidina 3-O-rutinósido (Pn-3-Rut); 4, cianidina (Cy); 5, petunidina (Pt); 6, peonidina (Pn). Tomado de Qin *et al.* (2009).

4. Justificación

Durante la DM los pulmones son susceptibles a desarrollar complicaciones desencadenadas por la hiperglucemia y el estrés oxidante, lo que empeora la condición diabética. Una alternativa para disminuir el daño causado por el estrés oxidante es el uso de plantas medicinales con propiedades antioxidantes. *P. indica* debido a su composición rica en compuestos fenólicos promete ser un buen tratamiento que ayude a prevenir el estrés oxidante y mejorar la condición diabética.

5. Hipótesis

El tratamiento con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* disminuye el estrés oxidante en los pulmones de ratas diabéticas.

6. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* en los pulmones de ratas diabéticas.

Objetivos específicos

- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico del fruto de *P. indica*.
- Evaluar el efecto antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* en mitocondrias de pulmones de ratas diabéticas.
- Evaluar el efecto antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* en suero de ratas diabéticas.

7. Materiales y Métodos

7.1 Experimentos *in vitro*

7.1.1 Material vegetal

Las muestras vegetales de la parte aérea (frutos) de *P. indica* se recolectaron en el invernadero del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y se almacenaron a una temperatura de 5°C protegidas de la luz. Posteriormente, se pulverizaron para su uso en la preparación del extracto metanólico.

7.1.2 Preparación del extracto

El extracto metanólico del fruto de *P. indica* fue preparado por adición de 250 ml de metanol a 50g de polvo del fruto y se mantuvo a 5°C durante cinco días. Después el extracto se filtró, se concentró en un rotavapor al vacío a una temperatura menor de 60°C, posteriormente, se secó a temperatura ambiente y se almacenó en la oscuridad a 5°C, hasta su uso.

7.1.3 Determinación de fenoles totales

La determinación de la cantidad de fenoles totales en el extracto fue medido espectrofotométricamente basándose en el método descrito por Singleton y Rossi (1965). A 10 µL del extracto metanólico del fruto de *P. indica* se le añadieron 90 µL de agua bidestilada y 750 µL de solución Folin-Ciocalteu preparada 1:10 con agua bidestilada estéril. Se sometió a agitación severa en vórtex durante 5 minutos. Posteriormente, se le agregaron 750 µL de solución acuosa de carbonato de sodio (Na₂CO₃) (6%), mezclando nuevamente y dejando reposar durante 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para luego obtener las lecturas de absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los valores se representaron como equivalentes de mg de ácido gálico/mg de fruto de *P. indica* de cada muestra.

7.1.4 Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides en el extracto fue determinado empleando el método descrito por Liu *et al.* (2002). A 10 μL del extracto metanólico del fruto de *P. indica* se le agregaron 490 μL de MeOH y se sometió a agitación en vórtex, posteriormente, se agregó 1 mL de MeOH, 100 μL de AlCl_3 (10%) y 100 μL de acetato de potasio ($\text{CH}_3\text{O}_2\text{K}$) (1 M). Se sometió a agitación severa en vórtex y se dejaron reposar 30 minutos en oscuridad. Las lecturas se realizaron a 415 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los valores se representaron como equivalentes a mg de quercetina/mg de fruto de *P. indica* de cada muestra.

7.1.5 Determinación de la actividad antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* por el método de DPPH \cdot

La actividad antioxidante del extracto fue evaluada en base a la capacidad de eliminar el radical libre 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH \cdot) en base al método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) con modificaciones para adaptarlo a nuestras condiciones. Las soluciones de los extractos fueron mezcladas con 1,000 μL de la solución metanólica de DPPH \cdot 1 mM. Las muestras fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente y la absorbencia se leyó a 517 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18. Las diferencias en absorbencia entre la muestra y el control (DPPH \cdot en etanol) fueron calculadas y expresadas como % de atrapamiento del radical DPPH \cdot . Se empleó una solución de ácido gálico como estándar de referencia.

7.1.6 Determinación de la actividad antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* por el método de eliminación de H_2O_2

La capacidad del extracto del fruto de *P. indica* para eliminar el H_2O_2 se evaluó por el método de Ruch *et al.* (1989). Se preparó una solución de H_2O_2 (40 mM) en buffer de fosfatos (50 mM pH 7,4). La concentración de H_2O_2 se determinó por absorbencia a 230 nm usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se añadió el extracto a 100 μL agua destilada, posteriormente se le agregó 1000 μL de H_2O_2 y se determinó la absorbencia después de 10 min contra una solución en blanco que contenía buffer fosfato sin H_2O_2 . El porcentaje de eliminación de H_2O_2 se calcula con la fórmula: % eliminado (H_2O_2) = $[(A_1 -$

$A_t) / A_i]$. Donde A_i es la absorbancia del control y A_t es la absorbancia de la prueba. Se empleó una solución de ácido gálico como estándar de referencia.

7.1.7 Ensayo de inhibición de la lipoperoxidación en mitocondrias de pulmón

Los niveles de lipoperoxidación se midieron con el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Estepa *et al.* (2001). A las mitocondrias (0.25 mg) se les agregó 25 mg/kg de peso mitocondrial del extracto metanólico de *P. indica*, posteriormente se le agregó solución de Hierro (Fe) 10 μ M o 100 μ M y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después se colocaron en tubos y fueron resuspendidas en medio de fosfatos 0.15 M. A cada tubo se le agregaron 2 ml de una solución ácida (ácido tricloracético 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N) y fueron calentados a baño María hirviendo durante 15 min, transcurrido este tiempo, los tubos fueron enfriados en hielo por 5 min y centrifugados a 7,500 rpm por 5 min. Se extrajo el sobrenadante y se determinó la absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los resultados se expresaron como nanomolas de TBARS/mg de proteína empleando el coeficiente de extinción molar del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2 Experimentos *in vivo*

7.2.1 Animales

Se emplearon ratas Wistar machos con un peso 300-450g. Se mantuvieron a temperatura ambiente con ciclos de 12 h día/noche. Se alimentaron con dieta estándar para roedores y agua *ad libitum*. Se siguieron las recomendaciones de la norma regulatoria para el uso de animales emitidas por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de las Normas Federales para el Uso y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

7.2.2 Inducción de la diabetes

La diabetes fue inducida mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (50 mg/kg de peso) disuelta en buffer de citrato (pH 4.5). Cinco días después de la administración de STZ, se determinaron los niveles de glucosa para confirmar la diabetes. Las ratas que mostraron los niveles de glucosa en sangre > 300 mg/dL se consideraron para el estudio.

7.2.3 Protocolo Experimental

Las ratas fueron divididas aleatoriamente en ocho grupos de cinco a seis ratas. Cuatro grupos de ratas fueron administradas vía oral (VO) por medio de una sonda orogástrica. Control (VO, DMSO 1%); Control + *P. indica* (VO, 25 mg/kg de peso); Diabético (VO, DMSO 1%); Diabético + *P. indica* (VO, 25 mg/kg de peso). Los cuatro grupos restantes fueron administradas vía nasal (VN) por medio de una micropipeta. Control (VN DMSO 1%); Control + *P. indica* (VN, 25 mg/kg de peso); Diabético (VN, DMSO 1%); Diabético + *P. indica* (VN, 25 mg/kg de peso). El tratamiento fue diario durante 30 días.

7.2.4 Efectos de *P. indica* sobre la glucemia y el peso corporal

Se realizaron las mediciones de los niveles de glucosa de los animales al inicio del tratamiento y posteriormente cada 5 días durante la administración del extracto usando un glucómetro comercial (Accu-Check Sensor III glucómetro) a través de una punción en la punta de la cola. El peso se registró cada 5 días durante los 30 días.

7.2.5 Obtención de muestras para las determinaciones bioquímicas y evaluación de la actividad antioxidante

Al término de los 30 días de tratamiento, los animales se mantuvieron en ayuno en un periodo de 12-14 horas y se sacrificaron por decapitación. Se colectó la sangre, se pesaron los pulmones y se tomó una muestra de este órgano. La sangre fue centrifugada y el suero separado para las estimaciones bioquímicas.

7.2.6 Aislamiento de mitocondrias de pulmones

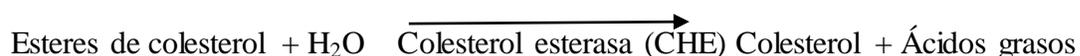
Las mitocondrias de pulmón fueron aisladas empleando la técnica descrita por Pecqueur y *et al.* (2001), con algunas modificaciones. Una vez obtenidos los pulmones y colocados en buffer TES (tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) 10 mM, ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) 1 mM y sacarosa 250 mM, a pH de 7.5) a 4°C, fueron homogeneizados empleando un homogenizador de vidrio con vástago de teflón impulsado con un motor. El homogenado fue centrifugado a 3,100 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) por 10 min, el sobrenadante fue centrifugado a 11,300 rpm por 10 min. El precipitado (homogenado) se resuspendió en 1 mL de Percoll al 15% en un gradiente preparado al 23% y 40% de Percoll. Se centrifugó a 19,250 rpm por 15 min. Se formaron tres bandas y se extrajo la fracción tres, se diluyó 1:4 con buffer TES (pH 7.5). Se centrifugó a 11,300 rpm por 10 min, el sobrenadante se eliminó. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de buffer de aislamiento y la cantidad de proteína fue determinada por el método de Biuret (Gornal *et al.*, 1949).

7.2.7 Determinaciones séricas de glucosa, colesterol y TAG

Los niveles de glucosa, colesterol y TAG se midieron espectrofotométricamente usando un equipo automatizado comercial (DRI-CHEM Nx500i). El método para la determinación de glucosa se basa en la oxidación enzimática catalizada a través de la reacción de Trinder, donde la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico, el (H_2O_2) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol 4-aminofenazona (4-AF) en presencia de peroxidasa (POD), dando un compuesto coloreado, se muestra el proceso en la siguiente reacción:



La determinación de colesterol total se basa en la hidrólisis enzimática y la oxidación con la reacción de Trinder, donde el colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:





La cuantificación de TAG se basa en un método colorimétrico enzimático utilizando glicerol-3-fosfato oxidasa, donde la presencia de TAG en la muestra origina un compuesto rojo según la reacción siguiente:



7.2.8 Determinación de los niveles de lipoperoxidación en suero

Los niveles de lipoperoxidación en el suero se determinaron empleando el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Estepa *et al.* (2001). Los TBARS están naturalmente presentes en muestras biológicas que incluyen a los hidroperóxidos lipídicos y aldehídos que aumentan su concentración como una respuesta al estrés oxidativo (Lovell *et al.*, 1995). Se obtuvieron las muestras de sangre con un ayuno de 12-14 horas sin anticoagulante. Posteriormente, se centrifugaron a 2500xg a T.A. y se separó el suero. Se colocaron 100 µL de suero en tubos tipo Falcón. Posteriormente, se le adicionó 1.5 ml de solución amortiguadora (Solución salina 0.9 %) y después se agregó 1.5 ml de reactivo cromógeno [5 g/L de ácido tiobarbitúrico (4,6-dihidroxipirimida-2 tiol) en dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.3% (V/V) en agua destilada]. Posteriormente, se incubó por 60 minutos en baño de hielo en oscuridad. Luego, se taparon los tubos y se llevaron a ebullición en baño María durante 60 minutos. Después se agregaron 3 ml de mezcla de extracción (0.5 mL agua destilada más 2.5 ml de n-butanol-piridina 15:1), los tubos se mezclaron y centrifugaron por 10 minutos. Al finalizar la centrifugación, se recolectó el sobrenadante y se midió la absorbencia a una longitud de onda 532 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. El resultado fue expresado en nmolas de

TBARS/ml de proteína empleando el coeficiente de extinción molar del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2.9 Evaluación de la actividad de los complejos mitocondriales I, II, III y IV

Para la determinación de la actividad de los complejos mitocondriales I, II, III y IV, las mitocondrias de pulmón intactas se permeabilizaron con Tritón al 10% como lo describió Hallberg *et al.* (1993). Las actividades enzimáticas se analizaron utilizando 0.3 mg/mL de mitocondrias permeabilizadas resuspendidas en buffer de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 50 mM. La actividad de la NADH-oxidoreductasa (complejo I), se analizó en mitocondrias de pulmón, las cuales se incubaron con 1.5 μg de antimicina A más 5 μL de cianuro de potasio (KCN) 0.4 M. Después de 5 minutos, se añadió 10 μL de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5 mM, se monitoreó la absorbencia a 340 nm por 1 minuto en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Después se añadió 10 μL de NADH 1 mM y se midió su oxidación durante 4 minutos. La tasa de oxidación de NADH se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de $16.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para NADH (Hallberg *et al.*, 1993). La actividad de la succinato-DCIP oxidoreductasa (complejo II), se midió en mitocondrias de pulmón, las cuales se incubaron con 5 μL de rotenona 2 mM, 5 μL de KCN 0.4 M y con 0.5 μg de antimicina A. Después de 5 minutos, se añadió 10 μL de 2,6 diclorofenolindofenol (DCIP), se monitoreó la absorbencia a 600 nm por 1 minuto en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Después, se añadió 10 μL de succinato 1 M y se midió la reducción del DCIP durante 4 minutos. La tasa de reducción de DCIP se calculó a partir de la pendiente de la gráfica de absorbencia utilizando el coeficiente de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para DCIP (Cortés-Rojo *et al.*, 2009). La actividad de la succinato-citocromo-oxidoreductasa (complejo III) sensible a la antimicina A, fue medida en mitocondrias de pulmón las cuales se incubaron con 5 μL de rotenona 2 mM más 5 μL de KCN 0.4 M. Después de 5 minutos, se agregó 4.5 μg de citocromo *c* oxidado, se monitoreó la absorbencia a 550 nm por 1 minuto en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Después se añadió 10 μL de succinato 1 M y se midió la reducción del citocromo *c*, después de 1 minuto se añadió 1 μg de antimicina A. La tasa de reducción del citocromo *c* se calculó a partir de las pendientes de las gráficas de absorbencia utilizando un coeficiente

de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo *c* (Cortés-Rojo *et al.*, 2009). La actividad del citocromo *c* oxidasa (complejo IV), se evaluó en mitocondrias de pulmón las cuales se incubaron con $1 \mu\text{g}$ de antimicina A más $5 \mu\text{L}$ rotenona 2 mM . Después de 5 minutos, se añadió $0.225 \mu\text{g}$ de citocromo *c* reducido, se monitoreó la oxidación del citocromo *c* reducido por 20 segundos a una absorbencia de 550 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Después se agregó $5 \mu\text{L}$ de KCN 0.4 M y se monitoreó por 1 minuto 10 segundos. La tasa de reducción del citocromo *c* se calculó a partir de las pendientes de las gráficas de absorbancia utilizando un coeficiente de extinción molar de $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el citocromo *c* (Cortés-Rojo *et al.*, 2009).

7.2.10 Determinación de los niveles de peroxidación de lípidos en mitocondrias de pulmones

Los niveles de lipoperoxidación mitocondrias de pulmón fueron determinados por el método descrito por Buege y Aust (1978) con algunas modificaciones para su optimización. Este método mide la producción de las TBARS entre las que se encuentra el MDA, un producto de la lipoperoxidación por radicales libres. Las mitocondrias (0.25 mg) fueron colocadas en tubos y resuspendidas en medio de fosfatos 0.15 M . A cada tubo se le agregaron 2 ml de una solución ácida (ácido tricloacético 15% , TBA 0.375% y HCl 0.25 N) y fueron calentados a baño María hirviendo durante 15 min , transcurrido este tiempo, los tubos fueron enfriados en hielo por 5 min y centrifugados a $7,500 \text{ rpm}$ por 5 min . Se extrajo el sobrenadante y se determinó la absorbencia a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los resultados se expresaron como nanomolas de TBARS/mg de proteína empleando el coeficiente de extinción molar del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2.11 Determinación de la actividad de la SOD y la GPx

La actividad de la SOD de las mitocondrias de pulmón fue determinada empleando un kit de análisis comercial (Sigma Aldrich, USA), el cual permite analizar la actividad de la SOD mediante un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio Dojindo's altamente soluble en agua, WST-1 (sal monosódica (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-

disulfofenil)-2H-tetrazolio) produce un tinte formazano cuando es reducida por el $O_2^{\cdot-}$. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el $O_2^{\cdot-}$ evitando su reacción con la sal. Las lecturas fueron tomadas a 440 nm empleado un lector de microplacas (Stat Fax 2100).

La actividad de la GPx en mitocondrias de pulmón fue analizada por el método de Ruch *et al.* (1989). Se preparó una solución de H_2O_2 (40 mM) en buffer de fosfatos (50 mM pH 7,4). La concentración de peróxido de hidrógeno se determinó por absorción a 230 nm usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se añadió el homogenado (0.25 mg) en 100 μ L buffer de fosfatos, posteriormente, se le agregó 1000 μ L de peróxido de hidrógeno y se determinó la absorbancia a 230 nm después de 10 min contra una solución en blanco que contiene buffer fosfato sin peróxido de hidrógeno. El porcentaje de eliminación de peróxido de hidrógeno se calcula de la siguiente manera: % eliminado (H_2O_2) = $[(A_i - A_t) / A_i]$. Donde A_i es la absorbancia del control y A_t es la absorbancia de la prueba.

7.2.12 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar (EE). La significancia estadística ($p < 0.5$) fue determinada con una prueba ANOVA de una vía empleando el software GraphPad Prism 5.

8. Resultados

8.1 Experimentos *in vitro*

8.1.1 Determinación de ácidos fenólicos y flavonoides totales del extracto metanólico del fruto de *P. indica*

Los ácidos fenólicos y los flavonoides son MS sintetizados por las plantas se caracterizan por presentar uno o varios grupos fenólicos en su estructura. Los ácidos fenólicos poseen una subunidad fenólica y los flavonoides poseen dos subunidades fenólicas (Esquivel-Gutiérrez *et al.* 2013). Varios estudios reportan que estos compuestos presentan múltiples actividades biológicas como antioxidantes, hipoglucemiantes, hipolipemiantes, antiinflamatorias entre otras (López-Carreras *et al.*, 2012). El contenido de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto metanólico del fruto de *P. indica* se presentan en el Cuadro 2. El contenido de ácidos fenólicos y flavonoides es similar o mayor al encontrado en otras frutas de distinta especie de planta o árboles, concluyendo que presentaban propiedades antioxidantes (Cuadro 1).

Cuadro 2. Contenido de ácidos fenólicos y flavonoides en el extracto metanólico del fruto de *P. indica*

Ácidos fenólicos totales (Equivalentes en mg de ácido gálico/mg de fruto de <i>Pi</i>)	Flavonoides totales (Equivalentes en mg de quercetina/mg de fruto de <i>Pi</i>)
15.46±0.01	23.62±0.01

Los valores representan la media ± EE. El experimento se realizó por triplicado. *Pi*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica*.

8.1.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH[•], el método de eliminación de H₂O₂ y por el método de inhibición de la lipoperoxidación.

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* por medio de tres ensayos, los dos primeros basados en la eliminación de diferentes RL y ERO

como el radical DPPH \cdot y el H $_2$ O $_2$ y el tercero basado en la inhibición de la oxidación lipídica inducida por Fe. Debido a que los compuestos presentes en el extracto metanólico pueden tener diferentes mecanismos para interactuar con los RL y las ERO, se esperaba un resultado diferente de la capacidad antioxidante dependiendo del ensayo utilizado (Yu *et al.*, 2002). En el cuadro 3 se muestra la actividad antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* para reducir el radical DPPH \cdot y el H $_2$ O $_2$. El ácido ascórbico se utilizó como control positivo debido a que hay diversos estudios donde reportan que es un potente antioxidante (Silencio-Barrita y Santiago-Sánchez, 2013). Al comparar la actividad antioxidante para reducir el radical DPPH \cdot del ácido ascórbico con la actividad antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* a la misma concentración (98.3 \pm 0.1% y 44.2 \pm 1.2%, respectivamente). Sin embargo, al aumentar la concentración del extracto metanólico a 5 mg, 10 mg y 25 mg, presentó una actividad antioxidante similar a la del ácido ascórbico para reducir el radical DPPH \cdot (99.91 \pm 0.0%, 99.92 \pm 0.0 y 99.98 \pm 0.0, respectivamente). Con respecto a los resultados de la capacidad de eliminación de H $_2$ O $_2$, el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentó menor actividad antioxidante que el ácido ascórbico a la misma concentración (82.6 \pm 6.4% y 58 \pm 0.5%, respectivamente). Mientras que la actividad del extracto metanólico a una concentración de 5 mg presentó un efecto similar para reducir al H $_2$ O $_2$ (82.3 \pm 1.2) al del ácido ascórbico. Por lo tanto, el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presenta actividad antioxidante para reducir los radicales DPPH \cdot y el H $_2$ O $_2$.

Cuadro 3. Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH \cdot y el ensayo del porcentaje de eliminación de H $_2$ O $_2$ el extracto metanólico del fruto de *P. indica*

Antioxidante	DPPH \cdot (%)	H $_2$ O $_2$ (%)
Ácido ascórbico (1 mg)	98.3 \pm 0.1	82.6 \pm 6.4
<i>Pi</i> (1 mg)	44.2 \pm 1.2*	58 \pm 0.5*
<i>Pi</i> (5 mg)	99.91 \pm 0.0 ⁺	82.3 \pm 1.2 ⁺
<i>Pi</i> (10 mg)	99.92 \pm 0.0 ⁺	-
<i>Pi</i> (25 mg)	99.98 \pm 0.0 ⁺	-

Los valores representan la media \pm EE. *Pi*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica*. El experimento se realizó por triplicado. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba

ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Ácido ascórbico (1 mg) vs. *Pi* (1 mg)). + $p < 0.05$ (*Pi* (1 mg) vs. *Pi* (5 mg); *Pi* (1 mg) vs. *Pi* (10 mg); *Pi* (1 mg) vs. *Pi* (25 mg)).

En la figura 7 se muestra el efecto del extracto metanólico de *P. indica* para inhibir la oxidación inducida por Fe en mitocondrias de pulmón. Hay diversos estudios *in vitro* donde reportan que a través de la reacción de Fenton (participa el Fe y O₂) se genera al radical hidroxilo (OH[•]) el cual es muy reactivo y es capaz de oxidar lípidos, proteínas y DNA, provocando daño y alteraciones estructurales (Valko *et al.*, 2005). Se evaluó la inhibición de la oxidación producida por hierro a través del ensayo de TBARS, fundamentado en la cuantificación de MDA, el cual es un producto de la lipoperoxidación provocada por RL (Haunk y Bernlohr, 2017). Cuando se observa la figura 5, hay un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de TBARS de las mitocondrias que se les adicionó Fe 100 μ M en comparación con las mitocondrias control (1.67 ± 0.1 TBARS (nmolas/mg de proteína) y 0.72 ± 0.1 TBARS (nmolas/mg de proteína), respectivamente), debido a que al radical OH[•] generado por el hierro oxidó las membranas de las mitocondrias de pulmón. Sin embargo, al comparar a las mitocondrias que se les adicionó hierro 100 μ M más el extracto metanólico del fruto de *P. indica* con las mitocondrias que solo se les adicionó Fe 100 μ M, se observó que se redujeron significativamente ($p < 0.05$) los niveles de TBARS (1.088 ± 0.2 y 1.67 ± 0.1 , respectivamente). Con estos resultados se observó que el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentó actividad antioxidante al inhibir la oxidación inducida por el hierro, debido a que reduce al radical OH[•] producido en la reacción de Fenton o mantuvo al Fe en su estado reducido, por lo que interferirá en la generación del radical OH[•].

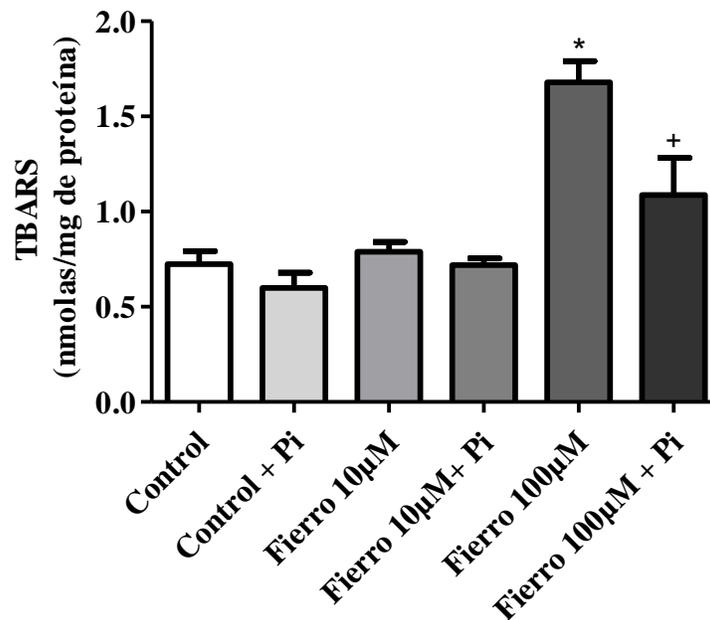


Figura 5. Inhibición de la lipoperoxidación en mitocondrias de pulmón inducida por fierro. Los valores representan la media \pm EE. *Pi*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg). El experimento se realizó por triplicado. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Fierro 100µM), ⁺ $p < 0.05$ (Fierro 100µM vs. Fierro 100µM + *Pi*).

8.2 Experimentos *in vivo*

8.2.1 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de glucosa y peso durante el tratamiento de 30 días

La DM se caracteriza por una hiperglucemia crónica desencadenada por una pobre acción de la insulina o por resistencia a ésta (American Diabetes Association, 2014). Por lo que fue de interés evaluar si el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentaba efecto hipoglucemiante. En la figura 6 se muestran los niveles de glucosa de los diferentes grupos administrados por VO y VN durante un periodo de 30 días. En la figura 6A se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) de los niveles de glucosa del grupo diabético con respecto

al grupo control durante el tratamiento, lo que indica un buen establecimiento de la condición diabética. Con respecto de los grupos administrados VO con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal, se observó que no presentó un efecto hipoglucemiante, debido a que no redujo los niveles de glucosa durante el tratamiento. En la figura 6B se presentan los grupos administrados VN con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal, donde se observó que no presentaron un efecto hipoglucemiante al igual que en la VO. Por lo tanto el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado a la concentración de 25 mg/kg de peso corporal tanto por VO como por VN no presenta efecto hipoglucemiante.

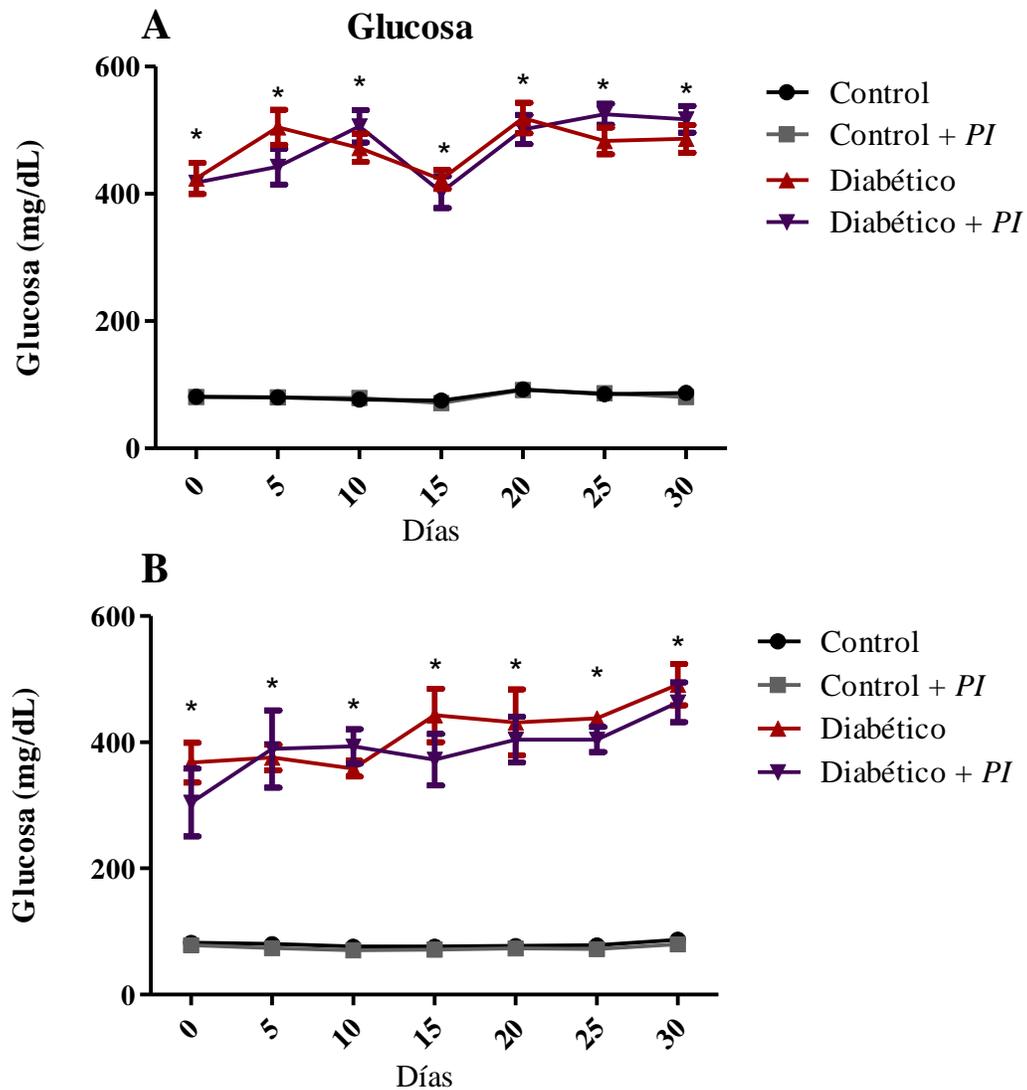


Figura 6. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de glucosa durante el tratamiento de 30 días. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n = 6-10$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

Fue de interés evaluar si el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentaba efecto sobre la pérdida de peso característico de la DM, debido a que durante la DM hay una descompensación metabólica desencadenada por su incapacidad de metabolizar a la glucosa, repercutiendo en la lipólisis de tejido adiposo y a la proteólisis (American Diabetes Association, 2014). En la figura 7, se muestran los pesos de los diferentes grupos administrados VO y VN durante un periodo de 30 días. En la figura 7A, se presentan los grupos administrados VO, se observa que el grupo diabético presenta una pérdida de peso significativa ($p < 0.05$) durante el tratamiento en comparación con el grupo control que presentó una ganancia de peso propia del crecimiento de los animales. En los grupos tratados VO con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal se observa que no hay efecto, debido a que no alteró la ganancia de peso en el grupo control tratado y la pérdida de peso en el grupo diabético tratado, en comparación con su control. En la figura 7B se presentan los grupos administrados VN con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal, donde se observó que el tratamiento no tuvo un efecto sobre la ganancia y pérdida de peso al igual que en la VO. Por lo tanto, el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado a la concentración de 25 mg/kg de peso corporal tanto por VO como por VN no presentó efecto sobre la ganancia o pérdida de peso.

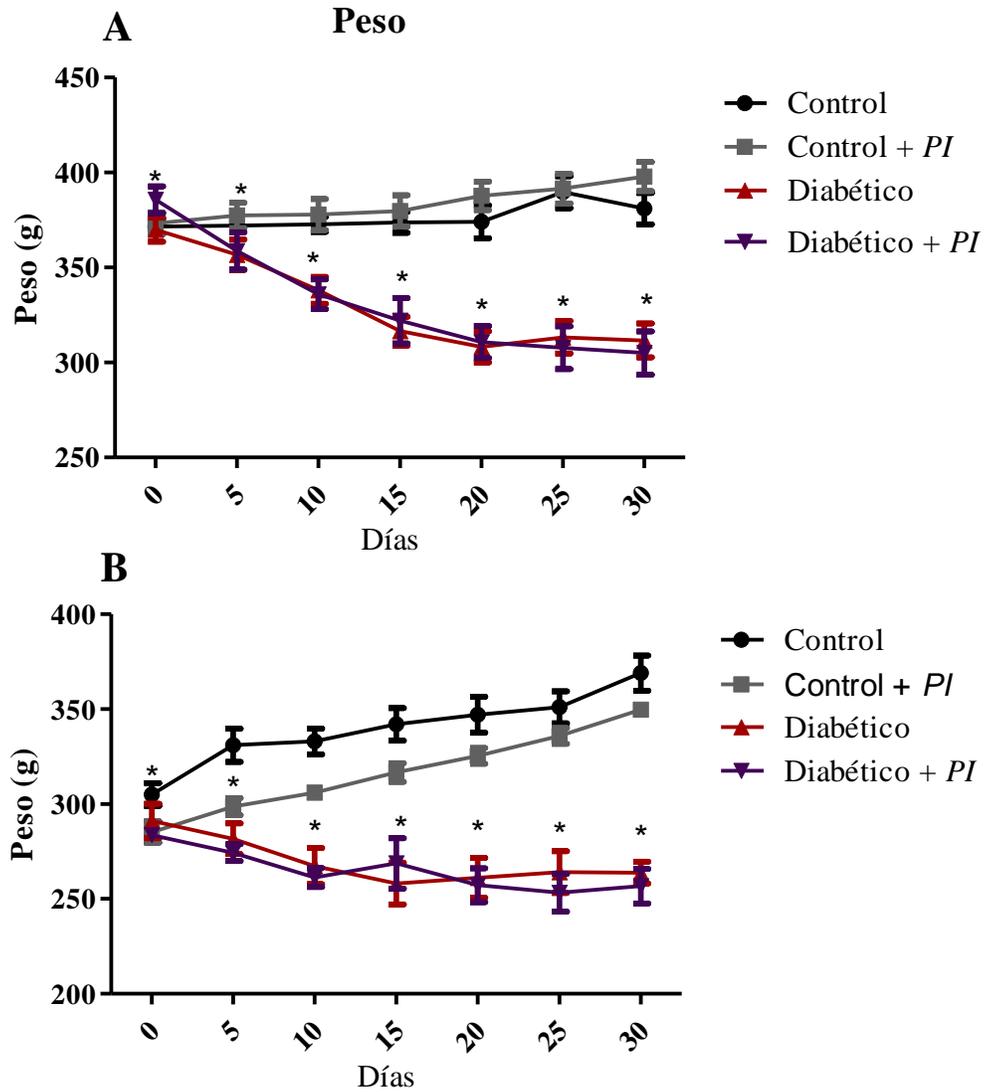


Figura 7. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre el peso durante el tratamiento de 30 días. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 6-10. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

8.2.2 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre el consumo de alimento y agua

En la DM se presenta el síntoma de polifagia caracterizado por un aumento en el consumo de alimento. Además se presenta la polidipsia caracterizado en el aumento en el consumo de agua, derivado del exceso consumo o ingesta de alimentos y por la hiperglucemia sérica (American Diabetes Association, 2014). Debido a lo anterior, fue de interés evaluar el efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre el consumo de alimento y agua cuando se administra VO y VN. En la figura 8A se presentan el efecto de la administración VO del extracto metanólico del fruto de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal sobre el consumo de alimento. Se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en el consumo de alimento del grupo diabético, con respecto del grupo control (41.1 ± 1.5 g y 24.9 ± 0.7 g, respectivamente), era lo esperado debido a la condición diabética. Con respecto con los grupos tratados con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* no se observó que afectaran el consumo de alimento tanto del grupo control como diabético tratados, con respecto a su control. En la figura 8B se muestra el efecto de la administración VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal sobre el consumo de alimento. Se muestra que el tratamiento VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica* no altera el consumo de alimento con respecto de sus controles, un comportamiento similar al presentado en el tratamiento VO.

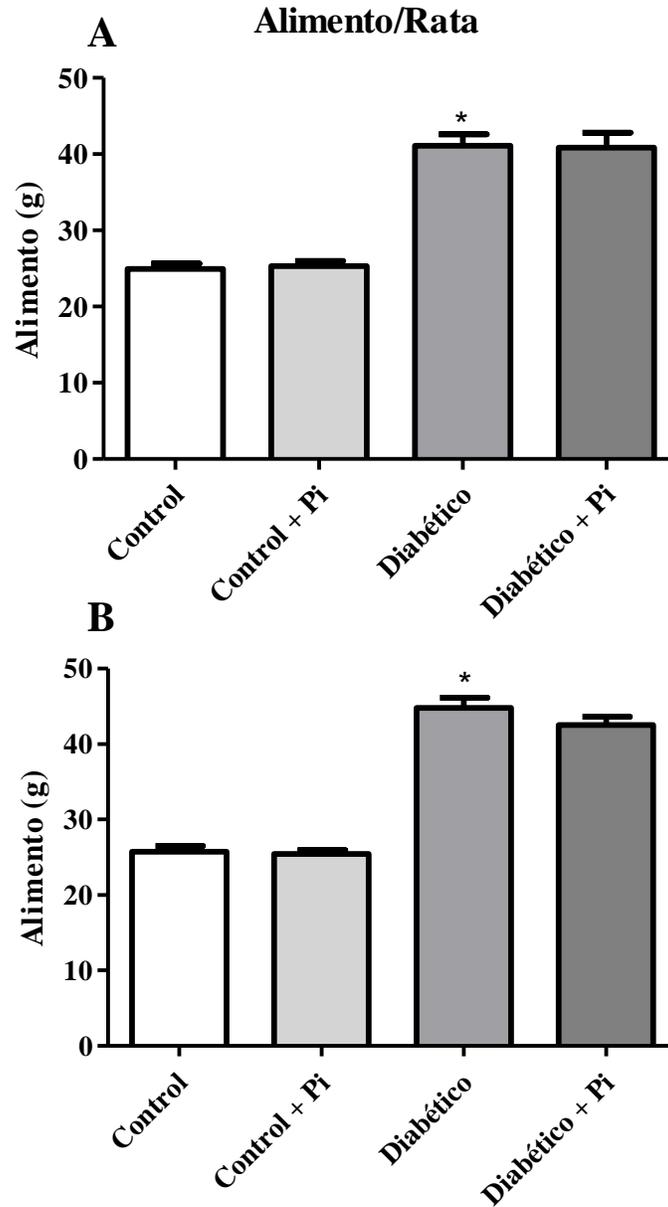


Figura 8. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre el consumo de alimento durante el tratamiento de 30 días. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 6-10. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

En la figura 9 se presenta el efecto del extracto metanólico de *P. indica* a una concentración de 25 mg/kg de peso corporal sobre el consumo de agua de los diferentes grupos administrados VO y VN. En la figura 9A se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en el consumo de agua del grupo diabético con respecto del grupo control (182.2 ± 9.2 mL y 41.5 ± 1.6 mL, respectivamente), era lo esperado debido a que el grupo diabético presentó el síntoma de la polidipsia. Con respecto a los grupos tratados con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* no se observó afectado el consumo de agua tanto del grupo control como del grupo diabético tratados, con respecto a su control sin tratamiento. En la figura 9B se muestra que el tratamiento administrado VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica* no altera el consumo de alimento con respecto de sus controles. Los resultados en ambas administraciones del extracto metanólico del fruto de *P. indica* no mostraron alteraciones en el consumo de agua.

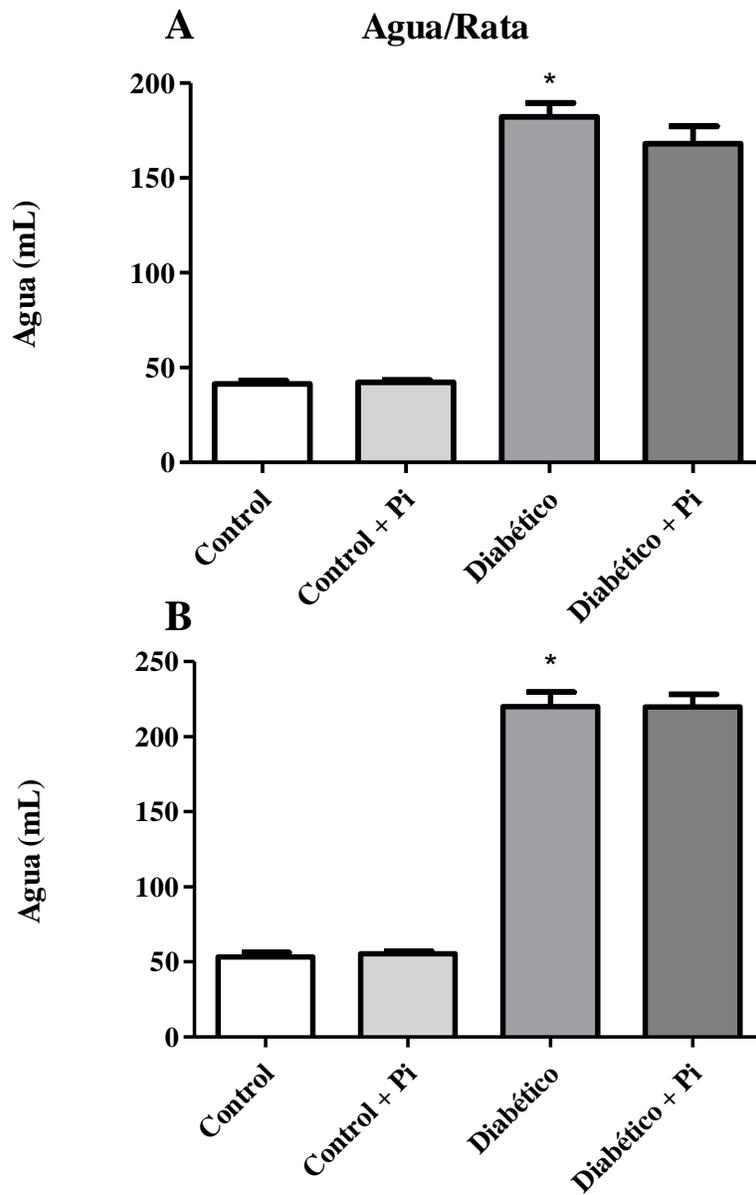


Figura 9. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre el consumo de agua durante el tratamiento de 30 días. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n = 6-10$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). $*p < 0.05$ (Control *v.s.* Diabético).

8.2.3 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de TBARS en suero

El estrés oxidante generado por la DM es responsable de la oxidación en los lípidos circulantes en suero afectando principalmente a los quilomicrones y las lipoproteínas. Lo anterior provoca alteraciones en los vasos sanguíneos. En la figura 10A, se muestra el efecto del extracto metanólico del fruto *P. indica* cuando se administró VO, se observa que el grupo diabético presenta mayor cantidad de TBARS en comparación del grupo control (8 ± 1.5 TBARS (nmolas/mg de proteína) y 4.4 ± 0.5 TBARS (nmolas/mg de proteína), respectivamente). Debido a que el grupo diabético presenta mayor estrés oxidante se favorece la oxidación de las lipoproteínas. Los grupos administrados con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentaron una tendencia a reducir los niveles de TBARS en comparación de los grupos no tratados (Control, 3 ± 0.3 TBARS (nmolas/mg de proteína) y Diabético, 6.4 ± 0.8 TBARS (nmolas/mg de proteína)). En la figura 10B, se muestra el efecto del extracto metanólico del fruto *P. indica* cuando se administró VN, el tratamiento presentó una tendencia similar al reducir los niveles de TBARS (Control, 2.4 ± 0.4 TBARS (nmolas/mg de proteína) y Diabético, 4 ± 0.5 TBARS (nmolas/mg de proteína)) a la observada en la VO. Los resultados anteriores sugieren que en la administración VO y VN el tratamiento con el extracto metanólico presenta una tendencia a reducir la lipoperoxidación de las lipoproteínas lo que puede favorecer a la disminución del daño provocado en los vasos sanguíneos.

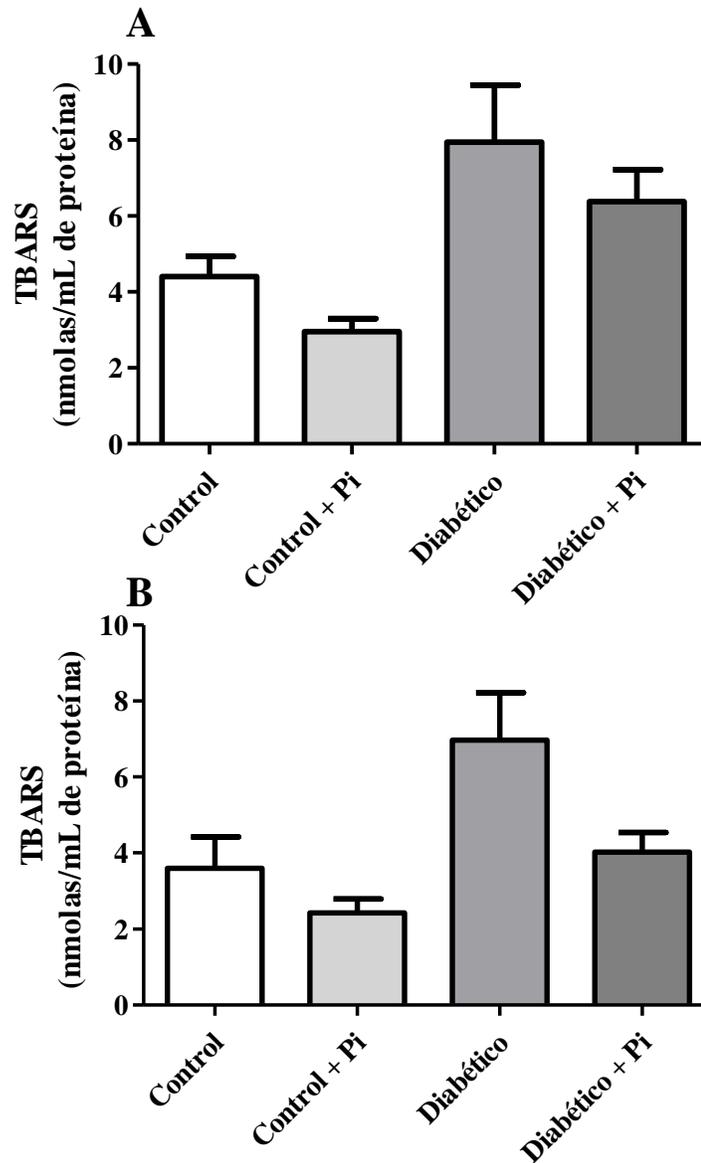


Figura 10. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de lipoperoxidación en suero. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n = 6-10$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). $*p < 0.05$ (Control *vs.* Diabético).

8.2.4 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de glucosa, colesterol y TAG séricos

Es importante señalar que para la medición de los niveles de glucosa, colesterol y TAG, se realizaron con el suero de ratas al finalizar el tratamiento, además, tenían un ayuno de 12-14 horas. En la figura 11A, se muestra que hay un aumento significativo ($p < 0.05$) de los niveles de glucosa en comparación del control (551.8 ± 12.5 mg/dL y 90.8 ± 4.6 mg/dL, respectivamente). Sin embargo, ambos grupos que recibieron el extracto metanólico del fruto de *P. indica* con administración VO no redujeron significativamente los niveles de glucosa (Control 90.5 ± 13.4 mg/dL y Diabético 505.6 ± 29.8 mg/dL). En la figura 11B, se muestra los valores de glucosa cuando se administró VN el extracto metanólico del fruto de *P. indica*, se observó que los grupos tratados no redujeron los niveles de glucosa significativamente (Control 79.2 ± 5.9 mg/dL y Diabético 489.1 ± 36.4 mg/dL) al compararlos con los grupos administrados con DMSO 1% (Control 80 ± 10.3 mg/dL y Diabético 526.8 ± 28 mg/dL). Con los resultados anteriores, se observó que el tratamiento con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado VO y VN tiende a reducir los niveles de glucosa en los grupos diabéticos.

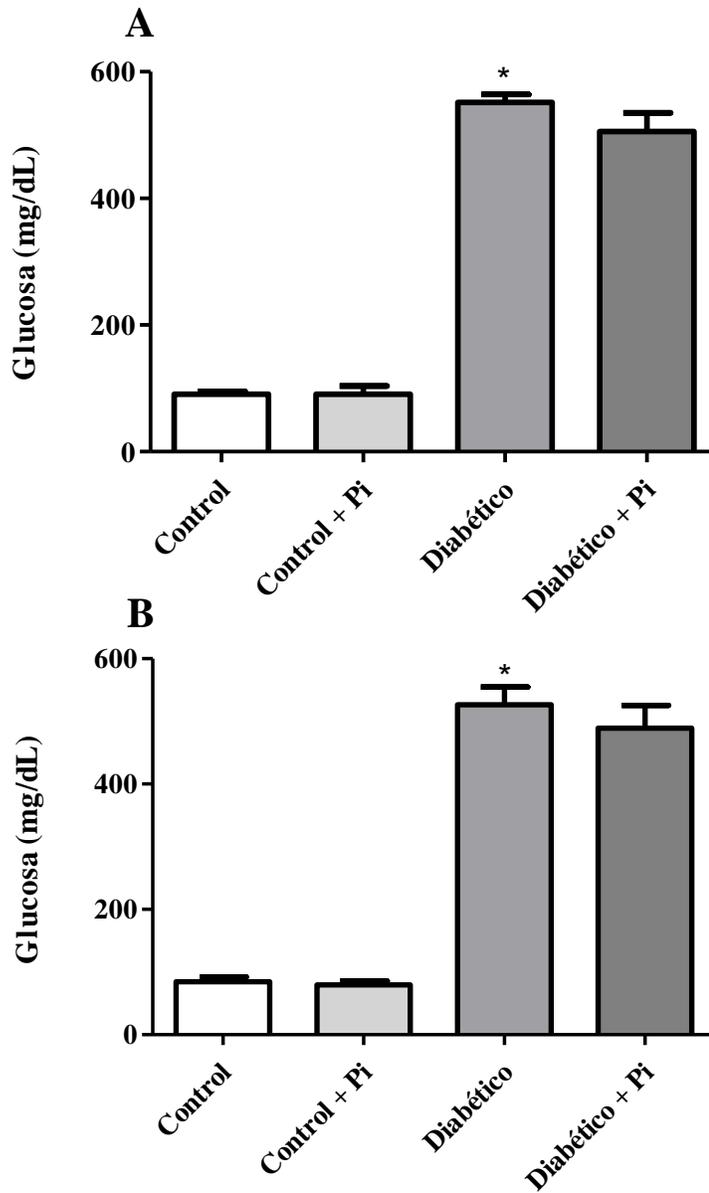


Figura 11. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de glucosa al final del tratamiento. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 6-10. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

En la figura 12 se muestran los niveles de colesterol de los distintos grupos. En la figura 12A, se observó que los grupos tratados con el extracto metanólico de *P. indica* VO mostraron una tendencia a reducir los niveles de colesterol (Control 65 ± 9.9 mg/dL y Diabético 66.4 ± 4.8 mg/dL) al compararlos con los grupos que se les administró DMSO 1% (Control 74.1 ± 4.6 mg/dL y Diabético 74.3 ± 4.7 mg/dL). En la figura 12B, se observó que los grupos que se les administró VN el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentaron una tendencia para reducir los niveles de colesterol (Control 53 ± 10.2 mg/dL y Diabético 62.5 ± 7.3 mg/dL), similar a lo observado en la VO al compararlos con los grupos que recibieron DMSO 1% (Control 64.4 ± 11.8 mg/dL y Diabético 74.1 ± 6.3 mg/dL). Con los resultados anteriores, se observó que el tratamiento con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado VO y VN presenta una tendencia a reducir los niveles de colesterol en los grupos diabéticos.

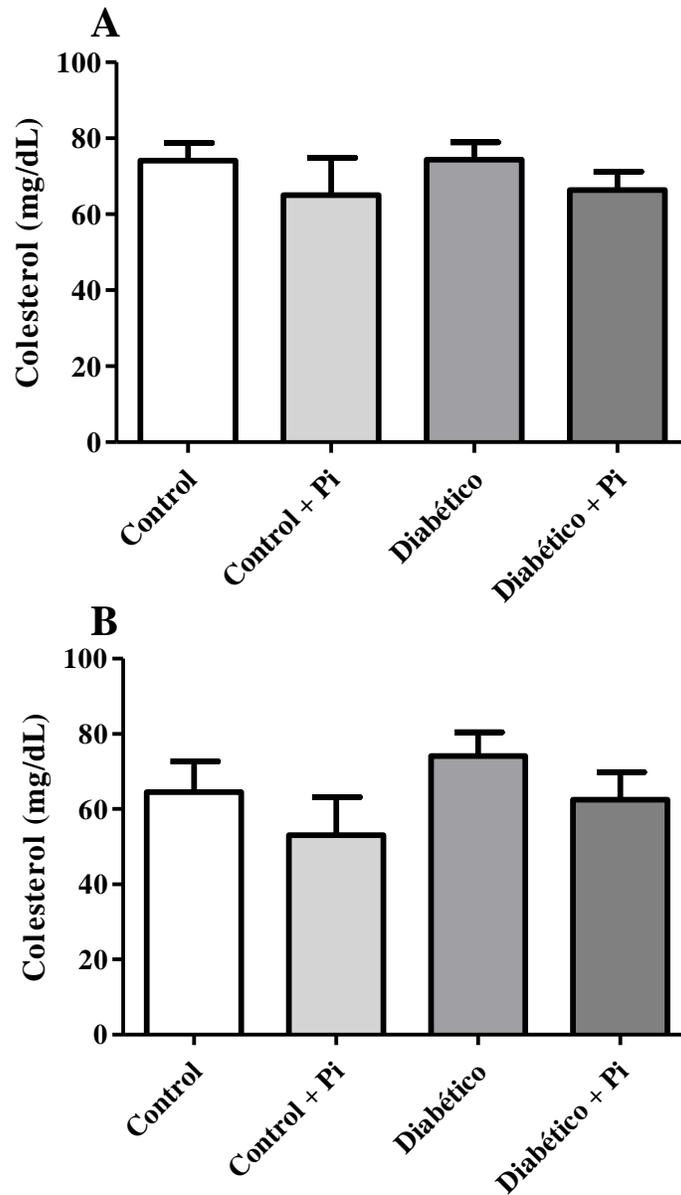


Figura 12. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de colesterol al final del tratamiento. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n= 6-10$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). $*p<0.05$ (Control *v.s.* Diabético).

En la figura 13 se muestran los niveles de TAG de los distintos grupos. En la figura 13A, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de los niveles de TAG en el grupo diabético al compararlo con el grupo control (161 ± 8.9 mg/dL y 82.1 ± 2.6 mg/dL, respectivamente). En los grupos tratados VO con el extracto metanólico de *P. indica* se observó que no redujeron los niveles de TAG significativamente (Control 80.5 ± 10.9 mg/dL y Diabético 153.8 ± 12.8 mg/dL) al compararlos con los grupos tratados con DMSO 1%. En la figura 13B, se muestra los valores de TAG, cuando se administró VN el extracto metanólico del fruto de *P. indica*, se observó que los grupos tratados no redujeron los niveles de TAG significativamente (Control 81.2 ± 10.2 mg/dL y Diabético 159.6 ± 21.9 mg/dL) al compararlos con los grupos administrados con DMSO 1% (Control 81.6 ± 3.2 mg/dL y Diabético 174.8 ± 24.2 mg/dL). Con los resultados anteriores, se observó que los grupos diabéticos que se les administró el extracto metanólico del fruto de *P. indica* VO y VN presentaron una tendencia a reducir los niveles de TAG.

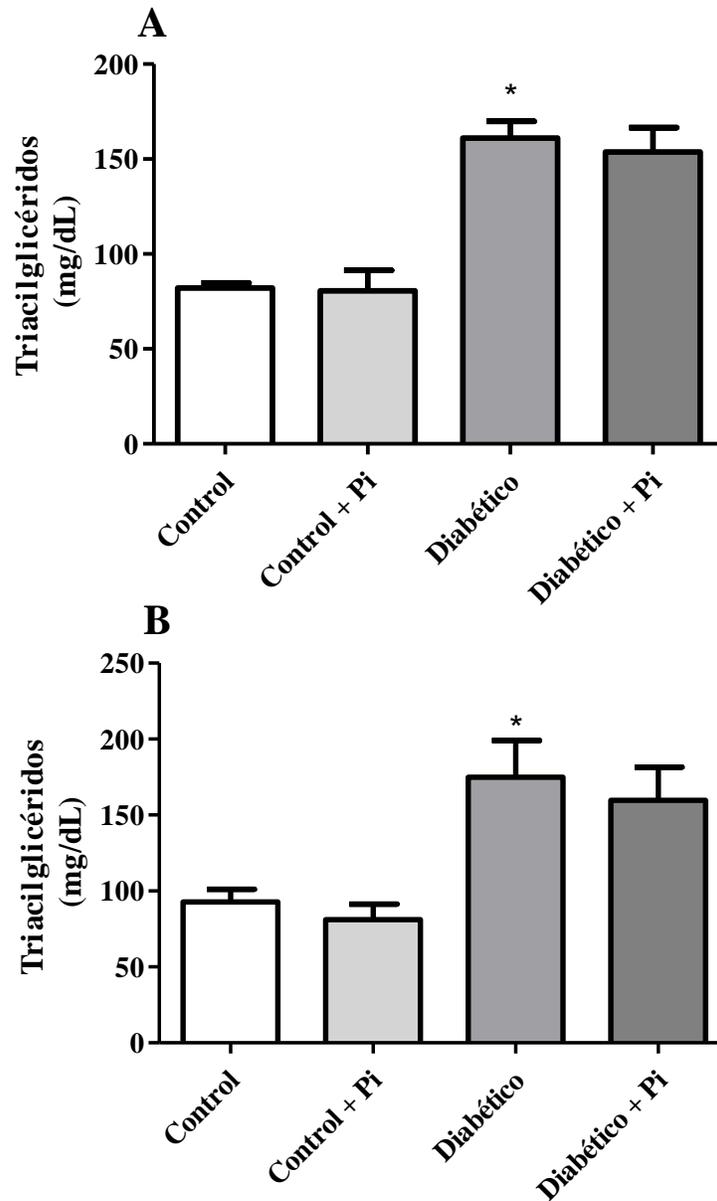


Figura 13. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de TAG al final del tratamiento. (A) Tratamiento VO. (B) Tratamiento VN. Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 6-10. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

8.2.5 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad de los complejos mitocondriales I, II, III y IV

En la figura 14 se muestra la actividad del complejo mitocondrial I. En la figura 14A se observó una disminución en la actividad del complejo mitocondrial I del grupo diabético (0.338 ± 0.03 mM NADH/min*mg proteína) al compararlo con el grupo control (0.505 ± 0.06 mM NADH/min*mg proteína). Esto se debe a que los RL y las EROS producidas aumenta en la DM, promueven la modificación de la estructura de las subunidades de los complejos mitocondriales, así como el ADN mitocondrial, lo que repercute en una disminución de su actividad. En los grupos tratados VO con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* mostraron una tendencia a aumentar la actividad del complejo mitocondrial I (Control 0.554 ± 0.08 mM NADH/min*mg proteína y Diabético 0.408 ± 0.05 mM NADH/min*mg proteína). En la figura 14B, se observó una tendencia a aumentar la actividad del complejo mitocondrial I en los grupos tratados VN con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* (Control 0.518 ± 0.1 mM NADH/min*mg proteína y Diabético 0.375 ± 0.07 mM NADH/min*mg proteína), similar a lo observado en la administración VO.

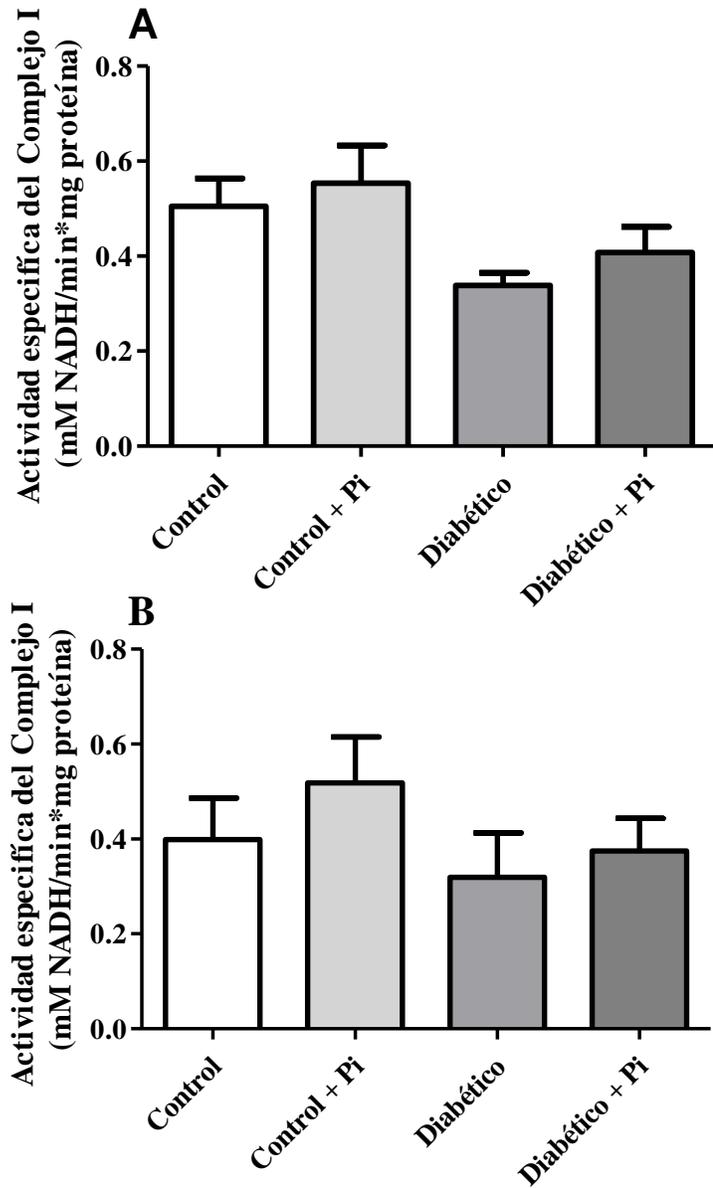


Figura 14. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad del Complejo I. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 6-8. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

En la figura 15 se presenta la actividad del complejo mitocondrial II. En la figura 15A, se muestra que el grupo diabético presenta menor actividad en el complejo mitocondrial II en comparación del grupo control (0.062 ± 0.0123 mM DCIP/min*mg proteína y 0.078 ± 0.01 mM DCIP/min*mg proteína, respectivamente). En los grupos administrados VO con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* se observa una tendencia a aumentar la reducción del DCIP (Control 0.09 ± 0.01 mM DCIP/min*mg proteína y Diabético 0.077 ± 0.01 mM DCIP/min*mg proteína) respecto a lo observado en los grupos tratados con DMSO 1%. En la figura 15B se muestran los grupos tratados VN con el extracto metanólico del fruto de *P. indica*, los cuales presentaron una tendencia a aumentar la actividad del complejo II (Control 0.093 ± 0.105 mM DCIP/min*mg proteína y Diabético 0.072 ± 0.01 mM DCIP/min*mg proteína), similar a lo observado en la administración VO.

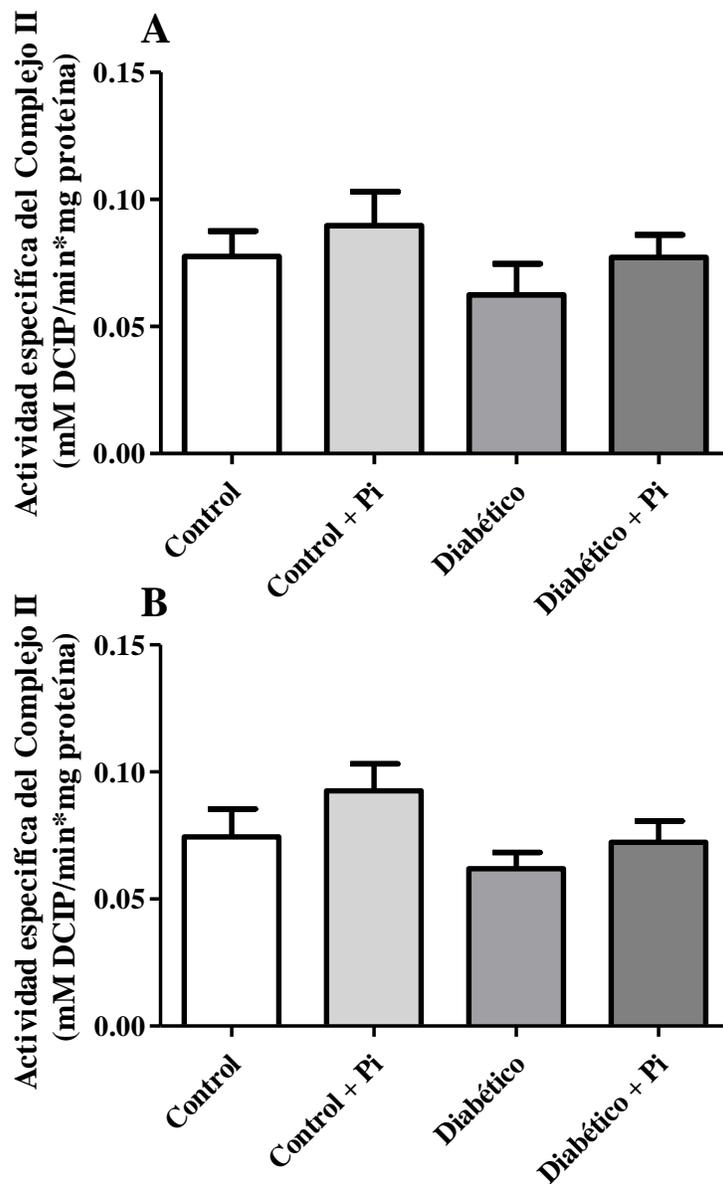


Figura 15. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad del Complejo II. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 5-8. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

En la figura 16 se muestra la actividad del complejo mitocondrial III. En la figura 16A, se observó una disminución en la reducción del citocromo *c* al compararlo con el grupo control (0.571 ± 0.09 mM Citocromo *c*/min*mg proteína y 0.693 ± 0.09 mM Citocromo *c*/min*mg proteína, respectivamente). Los grupos tratados VO con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* mostraron una tendencia a aumentar la reducción del citocromo *c* (Control 0.748 ± 0.07 mM Citocromo *c*/min*mg proteína y Diabético 0.65 ± 0.09 mM Citocromo *c*/min*mg proteína). En la figura 16B, se observó una actividad similar cuando se administró el extracto metanólico del fruto de *P. indica* VN (Control 0.763 ± 0.08 mM Citocromo *c*/min*mg proteína y Diabético 0.61 ± 0.08 mM Citocromo *c*/min*mg proteína) a la presentada en la VO.

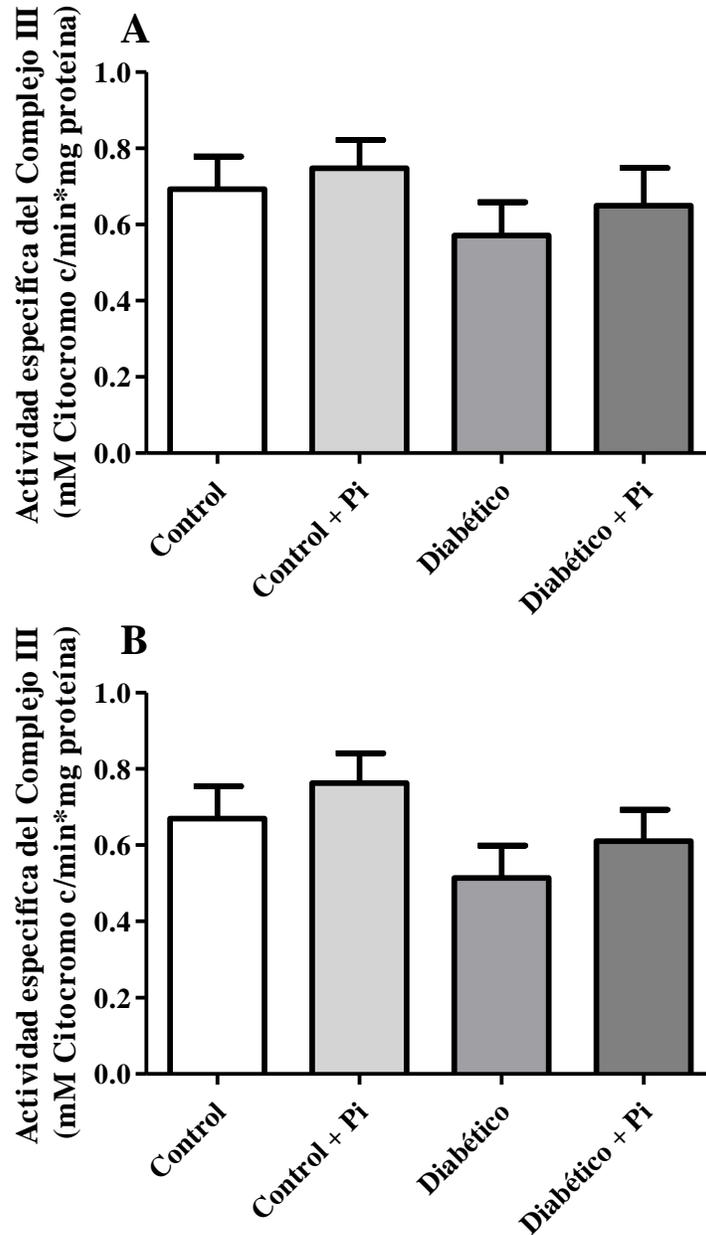


Figura 16. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad del Complejo III. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 6-9. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

En la figura 17 se presenta la actividad del complejo mitocondrial IV. En la figura 17A, se observó una disminución en la oxidación del citocromo *c* en el grupo diabético al compararlo con el grupo control (0.363 ± 0.92 mM Citocromo *c*/min*mg proteína y 0.451 ± 0.07 mM Citocromo *c*/min*mg proteína, respectivamente). En los grupos tratados VO con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* se observó una tendencia a aumentar la actividad del complejo IV (Control 0.535 ± 0.78 mM Citocromo *c*/min*mg proteína y Diabético 0.409 ± 0.08 mM Citocromo *c*/min*mg proteína) respecto a lo observado en los grupos administrados con DMSO 1%. En la figura 17B, se observó un efecto similar a lo presentado en la VO al aumentar la actividad del complejo mitocondrial IV cuando se administró el extracto metanólico del fruto de *P. indica* VN (Control 0.433 ± 0.06 mM Citocromo *c*/min*mg proteína y Diabético 0.364 ± 0.04 mM Citocromo *c*/min*mg proteína). Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* está reduciendo a los RL y a las ERO generadas en la mitocondria los cuales modifican y dañan al DNA mitocondrial lo que repercute en la estructura y funcionamiento de las subunidades mitocondriales, debido a que se observó una tendencia a aumentar la actividad de los complejos mitocondriales.

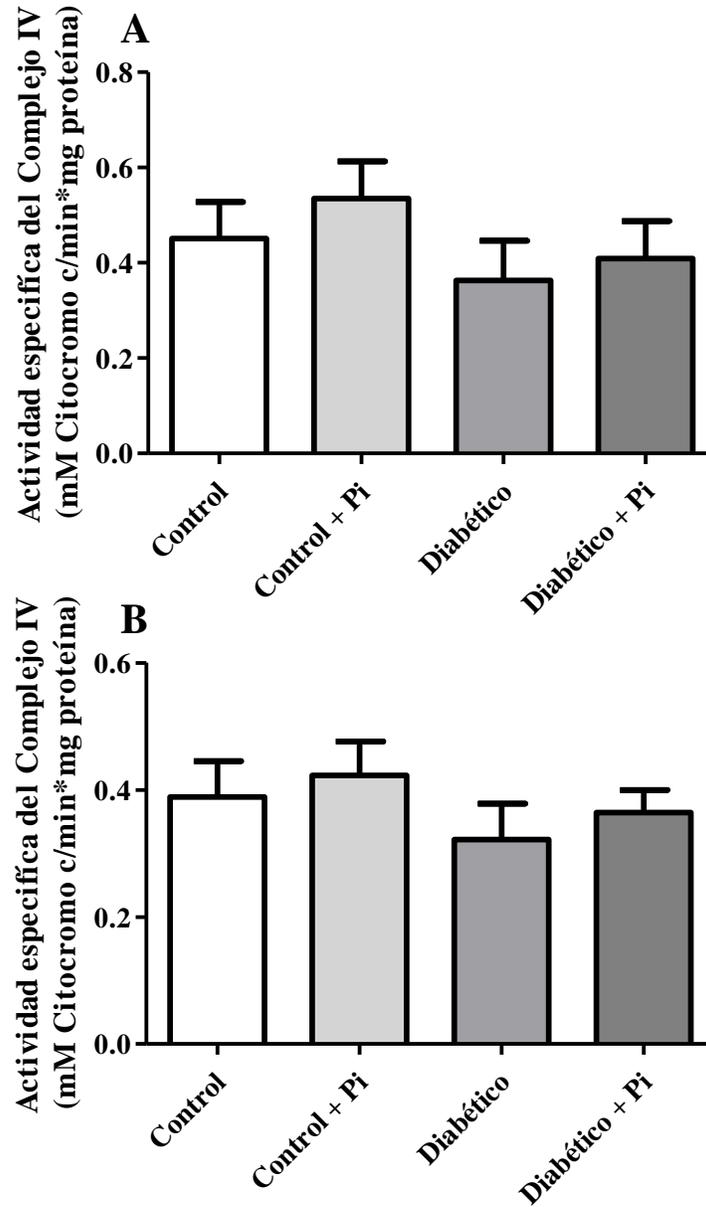


Figura 17. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad del Complejo IV. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n= 6-7$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). $*p<0.05$ (Control vs. Diabético).

8.2.6 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre los niveles de TBARS en mitocondrias de pulmón

Fue de interés evaluar el efecto antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la lipoperoxidación en mitocondrias de pulmón, utilizando como marcador de daño celular al MDA, debido a que hay reportes de que el estrés oxidante en la DM favorece la oxidación lipídica mitocondrial afectando la integridad mitocondrial así como su función (Haunk y Bernlohr, 2017). En la figura 18A, se observa que hay un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de TBARS en el grupo diabético en comparación del grupo control (4.3 ± 0.4 y 1.02 ± 0.2 , respectivamente), debido a que el grupo diabético presenta mayor oxidación lipídica desencadenada por la hiperglucemia y el estrés oxidante presente en la DM. El grupo diabético tratado con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* VO se observa que disminuye los niveles TBARS significativamente ($p < 0.05$) en comparación del grupo diabético (2.5 ± 0.4 y 4.3 ± 0.4 , respectivamente). En la figura 18B, se presenta el efecto antioxidante del extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado VN. El grupo diabético tratado con el extracto metanólico presenta un efecto similar a la administración VO al reducir los niveles de TBARS (2.6 ± 0.7). Con los resultados anteriores se observa que tanto la administración VO como VN presentan actividad antioxidante al reducir la oxidación lipídica, posiblemente se deba a que los compuestos fenólicos presentes en el extracto están reduciendo a las ERO y RL generados en la mitocondria, además reduciendo la generación del radical OH^\cdot y favorezca a una disminución del estrés oxidante intracelular. Este efecto observado, es similar al presentado por el extracto metanólico de *P. fulgens* que redujo significativamente los niveles de TBARS de hígado, cerebro, riñones y corazón de ratones que se les indujo DM con aloxán y se concluyó que tenía actividad antioxidante (Saio *et al.*, 2012).

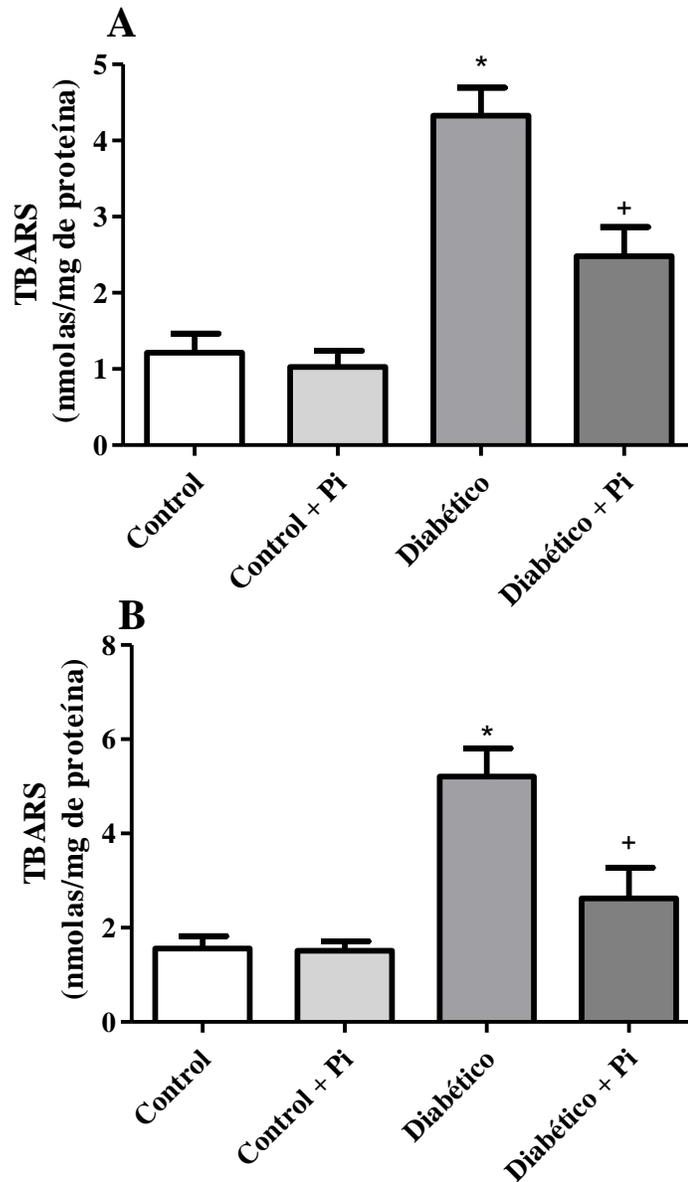


Figura 18. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la lipoperoxidación en mitocondrias de pulmón. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n=6-10$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p<0.05$ (Control vs. Diabético), + $p<0.05$ (Diabético vs. Diabético + *Pi*).

8.2.7 Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad de la GPx y la SOD en mitocondrias de pulmón

Se evaluó la actividad antioxidante de las enzimas GPx y la SOD, debido hay que estudios que mencionan que la actividad de la GPx y la SOD en el pulmón se ve disminuida durante la DM debido a la elevada producción de ERO y RL provenientes de las mitocondrias pulmonares (Hong *et al.*, 2016). En la figura 19A, se observó que el tratamiento con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado VO presenta una tendencia a aumentar la actividad de la GPx en los grupos tratados (Control 29.4 ± 2.8 y Diabético 23.1 ± 3.5) al compararlos con los administrados con DMSO 1% (Control 24.6 ± 2.9 y Diabético 13.7 ± 3.3). En la figura 19B, se presenta el efecto observado al administrar el extracto metanólico del fruto de *P. indica* VN, se observó que presentó una tendencia similar al aumentar la actividad de la GPx (Control 30.3 ± 3.4 y Diabético 22.7 ± 1.9) que la presentada en la VO.

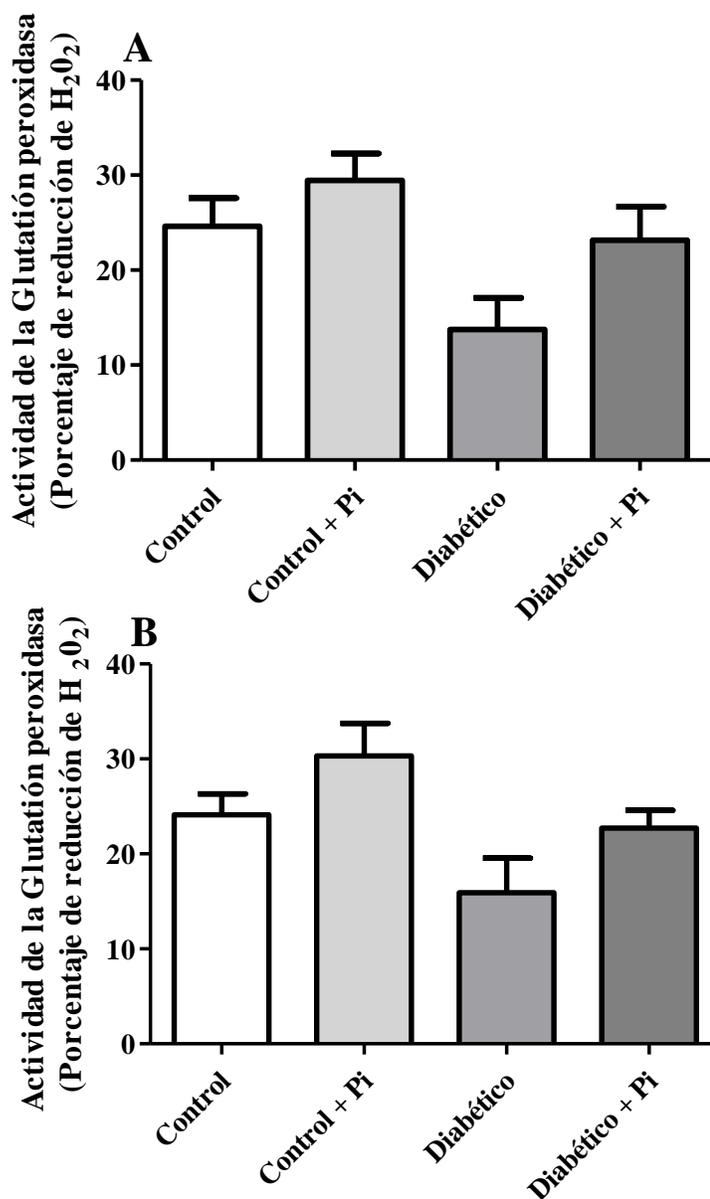


Figura 19. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad de la GPx en mitocondrias de pulmón. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. PI: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. n= 4-6. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). * $p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

En la figura 20 se muestra la actividad de la SOD en mitocondrias de pulmón. En la figura 20A, se muestra que hay una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad de la SOD en el grupo diabético en comparación del grupo control (5.4 ± 0.5 y 3.9 ± 0.3 , respectivamente). Se observó que los grupos tratados con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado VO presentaron mayor actividad de la SOD (Control 7.1 ± 0.6 y Diabético 5.1 ± 0.4). En la figura 20B, se presenta que ambos grupos tratados con el extracto metanólico del fruto de *P. indica* administrado VN presentaron mayor actividad de la SOD (Control 5.1 ± 0.3 y Diabético 4.2 ± 0.1) en comparación de los grupos tratados con DMSO al 1% (Control 4.3 ± 0.2 y Diabético 3.4 ± 0.2). Con los resultados anteriores se observó que tanto la VO como la VN el extracto metanólico del fruto de *P. indica* tuvo una tendencia a aumentar la actividad de la GPx y la SOD, lo que sugiere que se disminuyó el estrés oxidante el cual altera la actividad de ambas enzimas. La tendencia presentada fue similar al efecto observado con el extracto rico en compuestos fenólicos de *P. discolor* que presentó una actividad al aumentar la actividad enzimática de la SOD, así como aumentar los niveles de glutatión en ratas diabéticas inducidas con STZ, concluyendo que era un potencial antioxidante (Zhang *et al.*, 2010)

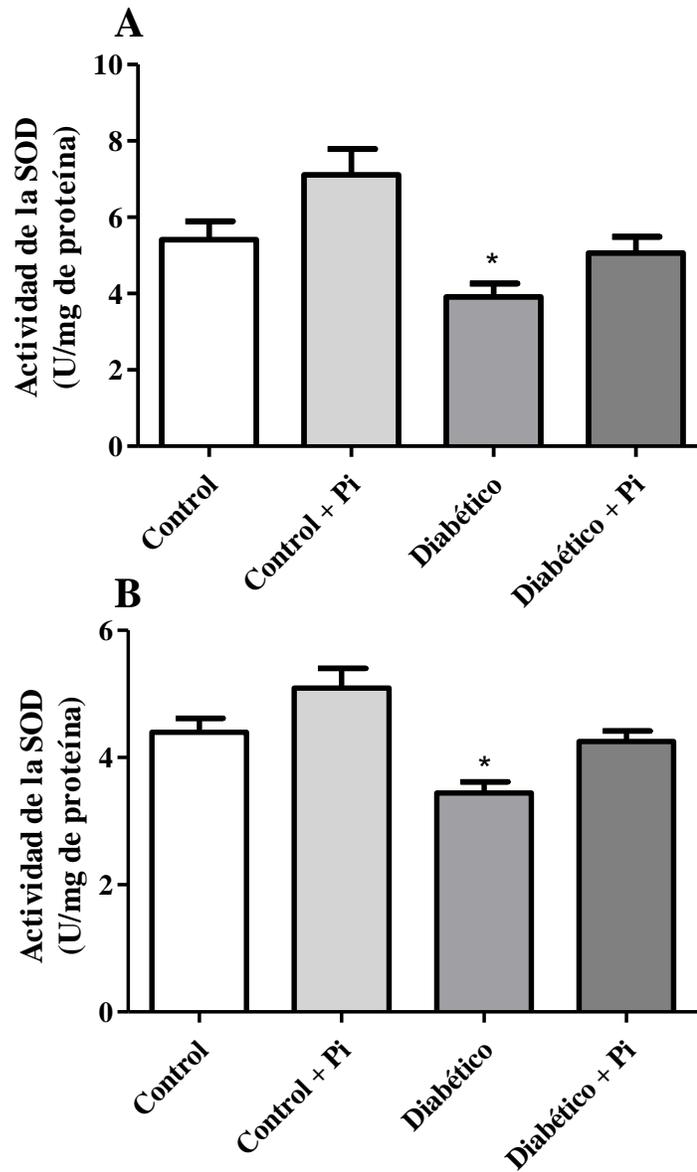


Figura 20. Efecto del extracto metanólico del fruto de *P. indica* sobre la actividad de la SOD en mitocondrias de pulmón. (A) Tratamiento vía oral (VO). (B) Tratamiento vía nasal (VN). Los valores representan la media \pm EE. *PI*: Extracto metanólico del fruto de *P. indica* (25 mg/kg peso). Tratamiento durante 30 días. $n = 6-10$. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA (Tukey). $*p < 0.05$ (Control vs. Diabético).

9. Discusión

La DM representa un problema a nivel mundial debido a una elevada prevalencia e incidencia que va en crecimiento cada día. La DM está caracterizada por presentar una hiperglucemia a consecuencia de defectos en la secreción o la acción de la insulina (American Diabetes Association, 2014). La hiperglucemia está relacionada con el desarrollo de las complicaciones de la DM. A consecuencia de la relación que presenta con la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a nivel mitocondrial (Forbes y Cooper, 2013). Se ha considerado al estrés oxidante como un factor para desarrollar diversas complicaciones como la microangiopatía (Honiden y Gong, 2009). Así como un aumento en los niveles de diversas moléculas modificadas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) por el estrés oxidante, las cuales pueden presentar cambios en las propiedades celulares del tejido pulmonar repercutiendo en las funciones biológicas (Hong *et al.*, 2016). El daño provocado por las ERO depende de la capacidad antioxidante de las enzimas antioxidantes presentes en la mitocondria para contrarrestarlas y no permitir que se genere una condición de estrés oxidante. Por lo que para prevenir o controlar el daño pulmonar provocado por la DM, debe tomarse en cuenta el consumo de compuestos antioxidantes que complementen el tratamiento. Una alternativa es el uso de plantas medicinales con propiedades terapéuticas para disminuir las complicaciones provocadas por la DM. Son una fuente rica en compuestos fitoquímicos con diversas propiedades con actividad biológica y debido a su naturaleza química tienen gran potencial para utilizarlos como agentes terapéuticos. Hay diversos estudios en los cuales se destacan una gran variedad de plantas mexicanas usadas en la fitoterapia para el tratamiento de la DM, como por ejemplo *Psacalium decompositum*, la *Columbrina elliptica* y *Agarista mexicana* que presentan efectos hipoglucemiantes, hipolipidémicos y antioxidantes (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Potentilla indica es una planta ampliamente distribuida en Asia, Europa y América. Tradicionalmente se ha utilizado de manera milenaria para el tratamiento de diversas afecciones como la lepra, fiebre, la inflamación del tejido, hematemesis, hiperglucemia y el cáncer (Zhu *et al.*, 2015). Sin embargo, para este estudio se evaluó el efecto antioxidante del fruto de *P. indica* cuando se administró a través de la VO y la VN, debido a su gran

contenido de diversos compuestos fenólicos, con potencial actividad antioxidante como destacan el ácido elálgico y glucósidos de ácido elálgico, como el ácido hidroxibenzóico y derivados del ácido hidroxicinámico, y flavonoides (Zhu *et al.*, 2015). Por lo que se consideró que el extracto metanólico del fruto de *P. indica* puede tener un potencial uso como antioxidante y protector contra el daño oxidativo provocado en la DM en el pulmón, por lo que debe ser evaluado.

Las determinaciones *in vitro* mostraron que el extracto metanólico del fruto de *P. indica* presenta actividad antioxidante, debido a su contenido de compuestos fenólicos. Se ha reportado que las moléculas antioxidantes como los polifenoles, los flavonoides y los taninos reducen a los RL, ERO y ERN debido a su capacidad de donar un átomo de hidrógeno (Msaada *et al.*, 2017). Además se realizaron pruebas *in vivo* para evaluar su efecto terapéutico como tratamiento para la DM.

Se observó la disminución de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I, II, III y IV en la DM, principalmente el complejo I, debido a que las subunidades están principalmente codificadas por ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial debido a su proximidad a las ERO producidas por la mitocondria se propone que es más susceptible al daño oxidativo. Se ha demostrado que la actividad del complejo I disminuye con la edad, múltiples enfermedades como la de Parkinson y la DM, donde se ha demostrado una correlación positiva en la disminución de la actividad y el aumento de la producción de ERO (Pollard *et al.*, 2016). El tratamiento VO y VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica* presentó una tendencia a aumentar la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en pulmón de los grupos diabéticos (Figura 14-17), debido a que, los ácidos fenólicos presentes en el extracto metanólico interactúan con las ERO y los RL generados por las mitocondrias pulmonares y los reducen a moléculas menos reactivas, por consiguiente, se disminuyen las mutaciones en el ADN mitocondrial y las modificaciones en las subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales, favoreciendo a que no se alteren la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en pulmón.

El estrés oxidante generado por la DM es responsable de la lipoperoxidación lo que desencadena alteraciones en la membrana y en los lípidos circulantes en suero como son los quilomicrones y lipoproteínas entre otros, lo que provoca alteraciones y disfunción de los

vasos sanguíneos (Di Marco *et al.*, 2013). La lipoperoxidación en la membrana mitocondrial afecta los componentes proteicos presentes, entre ellos la cadena transportadora de electrones, además de alterar el empaquetamiento, organización y arquitectura de los lípidos y la permeabilidad de la membrana, puede inhibir algunos procesos esenciales, tales como la síntesis de ATP, el transporte de metabolitos e iones y el bombeo de protones, provocando como resultado final la apoptosis de la célula (Hong *et al.*, 2016). En el tratamiento administrado VO y VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica* se observó un efecto antioxidante al reducir los niveles TBARS de las mitocondrias de pulmón en los grupos diabéticos (Figura 18), por lo que se propone que los compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico están interactuando y reduciendo a las ERO y los RL producidos en las mitocondrias disfuncionales, así como la producción del radical OH[•], lo que repercute en una disminución en el daño de la membrana mitocondrial y mejora su integridad, así como su funcionamiento. Los resultados observados en los complejos respiratorios mitocondriales corroboran se con una tendencia a aumentar su actividad.

Por otro lado, en los vasos sanguíneos disfuncionales debido a la hiperglucemia, la dislipidemia y el estrés oxidante, hay un aumento en la retención y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio de la íntima vascular (Di Marco *et al.*, 2013). La oxidación de las LDL promueve a la inflamación de los vasos sanguíneos, así como los presentes en el pulmón, a través de la activación del sistema inmune innato por medio de los macrófagos, formando células espumosas al fagocitar a las LDL oxidadas, además el sistema inmune adaptativo por medio de los linfocitos T, que en conjunto, promueven el aumento de citocinas proinflamatorias, favorecen al desarrollo de la microangiopatía y alteran el funcionamiento pulmonar (Di Marco *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en la oxidación lipídica en suero (Figura 10), sugieren una disminución de las ERO y ERN (Zhang *et al.*, 2010) lo que disminuye el daño en las membranas celulares. Además, quizá favorezca a disminuir la inflamación pulmonar desencadenada por las ERN (Frei y Higdon, 2003).

Existe evidencia de que la actividad y la expresión de las enzimas antioxidantes durante la DM se altera (Forbes y Cooper, 2013). Por ejemplo, en el caso de la enzima GPx, es debido a una disminución del glutatión reducido a consecuencia de una alteración en la

actividad de la enzima glutatión reductasa que es dependiente de NADPH, a través de la elevada actividad de la vía de los polioles (Forbes y Cooper, 2013). En el tratamiento administrado VO y VN con el extracto metanólico del fruto de *P. indica*, se observó una tendencia a aumentar la actividad de la GPx (Figura 19), a consecuencia de que el extracto metanólico aumentó los niveles de glutatión reducido, debido a que pudo reducir al glutatión oxidado o al NADP, para favorecer un aumento de las reservas de glutatión reducido.

Hay diversos estudios que mencionan que el gen que codifica para la enzima SOD mitocondrial es susceptible mutaciones por las ERO y RL, lo que altera su actividad (Pourvali *et al.*, 2016). Además, se ha mencionado que durante la DM la actividad de la SOD en pulmón disminuye a través de su glucosilación y por la sobre producción de RL y ERO en la mitocondria (Hong *et al.*, 2016). La administración VO y VN del extracto metanólico del fruto de *P. indica* mostró una tendencia a mejorar la actividad de la SOD mitocondrial (Figura 20); esto se debe a que quizá los componentes de naturaleza fenólica presentes en el extracto metanólico, interactuaron con los RL y ERO (Saio *et al.*, 2012) formados por la mitocondria y evitaron que estos propiciaran mutaciones en el gen que codifica para la SOD mitocondrial.

Todos estos resultados muestran beneficios del consumo del extracto metanólico a nivel pulmonar y en suero, sin embargo, será necesario realizar más estudios para comprobar su efecto antiinflamatorio, y además, otros estudios para evaluar si mejora la integridad de la membrana mitocondrial.

10. Resumen de resultados

- El extracto metanólico del fruto de *P. indica* presenta actividad antioxidante *in vitro* ya que reduce al radical DPPH[•], al H₂O₂ y la oxidación inducida por el fierro en mitocondrias de los pulmones.
- El extracto metanólico del fruto de *P. indica* reduce la lipoperoxidación en suero.
- El extracto metanólico del fruto de *P. indica* tiende a aumentar la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales.
- El extracto metanólico del fruto de *P. indica* presenta actividad antioxidante en mitocondrias de pulmón ya que reduce la lipoperoxidación, tiende a aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx) y previene el daño mitocondrial.

11. Conclusión

El extracto metanólico del fruto de *P. indica* tiene actividad antioxidante sobre las mitocondrias de pulmón y en suero.

12. Perspectivas

- Determinar niveles de citocinas proinflamatorias en suero.
- Evaluar la integridad de la membrana mitocondrial mediante la medición del consumo de oxígeno.
- Determinar la permeabilidad de la membrana a través su mecanismo natural (Ca^{+2}).

13. Referencias

- American Diabetes Association. 2014. Diagnoses and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*: (37): 581-590
- Alvarado A. y Arce I. 2016. Metabolic Functions of the Lung, Disorders and Associated Pathologies. *J Clin Med Res* 8(10): 689–700
- Ávalos A. y Pérez-Urriá E. 2009. Metabolismo Secundario de Plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2 (3): 119-145
- Bermúdez V., Bermúdez F., Arraiz N., Leal E., Linares S., Mengual E., Valdelamar L., Rodríguez M., Seyfi H., Amell A., Carrillo M., Silva C., Acosta A., Añez J., Andara C., Angulo V., y Martins G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* (26): 76-86
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. y Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25–30
- Buege J. A. y Aust S. D. 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology* 52(C): 302-10
- Chomova M., Tatarkova Z., Dobrota D. y Racay P. 2012. Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochemical Research* 37(5): 965–976
- Cortés-Rojo C., Calderón-Cortés E., Clemente-Guerrero M., Estrada-Villagómez M., Manzo-Avalos S., Mejía-Zepeda R., Boldogh I. y Saavedra-Molina A. 2009. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41(1): 15-28
- Delgado-Sánchez G., García-García L., Castellanos-Joya M, Cruz-Hervert P., Ferreyra-Reyes L., Ferreira-Guerrero E., Hernández A., Ortega-Baeza V. M., Montero-Campos R., Sulca J. A., Martínez-Olivares M. L., Mongua-Rodríguez N., Baez-Saldaña R., González-Roldán J. F., López-Gatell H., Ponce-de-León A., Sifuentes-Osornio J. y Jiménez-Corona M. E. 2015. Association of Pulmonary

Tuberculosis and Diabetes in Mexico: Analysis of the National Tuberculosis Registry 2000–2012. *PLoS One*. 10(6): e0129312

- Basset G., Crone C. y Saumon G. 1987. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J. Physiol.* 384: 325–345.
- Dhandapani S., Subramanian V. R., Rajagopal S. y Namasivayam N. 2002. Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*. 46(3): 251-255.
- Di Marco E. D., Gray S. P. y Jandeleit-Dahm K. 2013. Diabetes alters activation and repression of pro- and anti-inflammatory signaling pathways in the vasculature. *Frontiers in Endocrinology* 4(68): 1-10
- Esquivel-Gutiérrez E. R., Noriega-Cisneros R., Saavedra-Molina A. y Salgado-Garciglia R. 2013. Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties. *PharmacologyOnline Newsletter* 2: 15-23.
- Estepa V., Ródenas S. y Martín M.C. 2001. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm.* 67(3): 1-17.
- Forbes J. M. y Cooper M. E. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1): 137-188.
- Frei B. y Higdon J. V. 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols *in Vivo*: Evidence from Animal Studies. *The Journal of Nutrition* 133(10): 3275-3284
- Gal B. y Lopez M. 2007. Bases de la Fisiología. Editorial Tebar. 2º Edición
- Gornal A. G., Bardavill C. J. y David M. M. 1949. Determination of proteins by mean of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-760
- Goutos I., Nicholas R. S., Pandya A. A. y Ghosh S. J. 2015. Diabetes mellitus and burns. Part I-basic science and implications for management. *International Journal of Burns and Trauma* (1): 1-12
- Giacco F. y Brownlee M. 2010. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research* (107): 1058-1070
- Grace M. H., Ribnicky D. M., Kuhn P., Poulev A., Logendra S., Yousef G. G., Raskin I. y Lila M. A. 2009. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich

formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine* (16): 406–415

- Hallberg E. M., Shu Y. y Hallberg R. L. 1993. Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix—targeted and intermembrane-targeted proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13(5): 3050–3057
- Haunk A. K. y Bernlohr D. A. 2017. Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research* (57): 1976-1986
- Hernández-Ávila M., Gutiérrez J. P. y Reynoso-Noverón N. 2013. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud pública de México* (51): 129-136
- Hong Z., Jinzi W., Zhen J. y Liang-Jun Y. 2016. Potential Biochemical Mechanisms of Lung Injury in Diabetes. *Aging and Disease* (10): DOI: 10.14336/AD.2016.0627
- Honiden S. y Gong M. N. 2009. Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. *Critical Care Medicine* (8): 2455–2464
- Hu W., Shen W. y Wang M. H. 2009. Free Radical Scavenging Activity and Protective Ability of Methanolic Extract from *Duchesnea indica* Against Protein Oxidation and DNA Damage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (14): 277-282
- Kalsi K. K., Baker E. H., Fraser O., Chung Y., Mace O. J., Tarelli E., Philips B. J. y Baines D. L. 2008. Glucose homeostasis across human airway epithelial cell monolayers: role of diffusion, transport and metabolism. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (457): 1061–1070
- Kasabri V., Afifi, F.U. y Hamdan I. 2011. Evaluation of the acute antihyperglycemic effects of four selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Pharm Biol.* 49(7): 687-695.
- Karim S., Adams D. H. y Lalor P. F. 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World Journal Gastroenterol* (18): 6771-6781
- Kerr J.S., Fisher A. B. y Kleinzeller A., 1981. Transport of glucose analogues in rat lung. *J. Physiol.* 241: E191–E195

- Klein O. L., Krishnan J. A., Glick S. y Smith L. J. 2012. Systematic review of the association between lung function and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* (9): 977-87
- Liu M., Xing, Q. L., Weber C., Yong L. Ch., Brown J. y Liu R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem* 50: 2926:2930
- López-Carreras N, Miguel M. y Aleixandre A. 2012. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. clín. diet. hosp.* 32(3): 81-91
- Lovell M. A., Ehmann W. D., Butler S. M. y Markesbery W. R. 1995. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45(8): 1594-1601
- Maldonado O., Ramírez I., García J. R., Ceballos G. M. y Méndez E. 2012. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 43(2): 7-22
- Meyer H. R. y Richter W. 2001. Freeze-Fracture Studies on Lipids and Membranes. *Micron* 32(1): 615-644
- Moo-Huchin V. M., Moo-Huchin M. I., Estrada R. J., Cuevas-Glory L., Estrada I., Ortiz-Vázquez E., Betancur D. y Sauri E. 2015. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* 166 (2015): 17-22
- Msaada K., Jemia M. B., Salem N., Bachrouch O., Sriti J., Tammar S., Bettaieb I., Jabri I., Kefi S., Limam F. y Marzouck B. 2017. Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruit varieties. *Arabian Journal of Chemistry* 10(2): 3176-3183
- Pecqueur C., Alves-Guerra M. C., Gelly C., Lévi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F. y Muroux B. 2001. Uncoupling Protein 2, *in Vivo* Distribution, Induction upon Oxidative Stress, and Evidence for Translational Regulation. *J. Biol. Chem.* 276 (12): 8705-8712
- Plants DB. 2016. *Duchesnea indica* (Falsa fresa). Disponible en <http://www.plantsdb.gr/es/plants-library/herbaceous/313-duchesnea-indica>

- Pollard A. K., Craig E. L. y Chakrabarti L. 2016. Mitochondrial Complex 1 Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration. *PLOS ONE* 11(6): 1-9
- Pourvali K., Abbasi M. y Mottaghi A. 2016. Role of Superoxide Dismutase 2 Gene Ala16Val Polymorphism and Total Antioxidant Capacity in Diabetes and its Complications. *Avicenna J Med Biotechnol* 8(2): 48–56
- Prost N. y Saumon G. 2007. Glucose transport in the lung and its role in liquid movement. *Respiratory Physiology & Neurobiology* (159): 331–337
- Ptilovanciv E.O., Fernandes G. S., Teixeira L. C., Reis L. A., Pessoa E. A., Convento M. B., Simões M. J., Albertoni G, A., Schor N. y Borges F. T. 2013. Heme oxygenase 1 improves glucoses metabolism and kidney histological alterations in diabetic rats. *Diabetology y Metabolic Síndrome* 5(3): 1-8
- Qiao W., Zhao C., Qin N., Zhai H. Y. y Duan H. Q. 2011. Identification of trans-tiliroside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects from *Potentilla chinesis*. *Journal of Ethnopharmacology* (135): 515-521
- Qin C., Li Y., Zhang R., Niu W. y Ding Y. 2009. Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mock strawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Natural Product Research* (23): 1589–1598
- Ramos M., Batista C., Gómez B. y Zamora A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Medigraphic* 3(1):7-15
- Ruch R. J. Cheng S. J. y Klaunig, J. E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen* 10: 1003–1008
- Saio V., Syiem D. y Sharma R. 2012. Effect of *Potentilla fulgens* on lipid peroxidation and antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* (3): 249-254
- Saldaña-Balmori Y., Ramírez-González y Delgadillo-Gutiérrez H. 2003. Acción de algunos antiinflamatorios no esteroideos sobre la lipoperoxidación hepática inducida por etanol. *Revista Cubana Invest Biomed* 22(1): 16-24

- Seino Y., Nanjo K., Tajima N., Kadowakj T., Kashiwagi A., Araki E., Ito C., Inagaki N., Iwamoto Y., Kasuga M., Hanafusa T., Haneda M. y Ueki K. 2010. Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*. (1): 212-228
- Shah K., DeSilva S. y Abbruscato T. 2012. The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* (13): 12629-12655
- Singleton, V. L. y Rossi, J. A. Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic* 16: 144-158.
- Silencio-Barrita J. L. y Santiago-Sánchez M. 2013. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* (3): 953-978
- Soriano L. A. 2013. Contenido antioxidante en Damiana (*Turnera diffusa Willd.*) y factores que lo modifican: condiciones ambientales, de cultivo y manejo poscosecha. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Disponible en: http://cybertesis.cibnor.mx:8080/sdx/cibnor/2013/soriano_1.pdf
- Ptilovanciv E.O., Fernandes G. S., Teixeira L. C., Reis L. A., Pessoa E. A., Convento M. B., Simões M. J., Albertoni G, A., Schor N. y Borges F. T. 2013. Heme oxygenase 1 improves glucoses metabolism and kidney histological alterations in diabetic rats. *Diabetology y Metabolic Síndrome* 5(3): 1-8
- Taskinen M. R. 2003. Diabetic dyslipidemia: from basic research to clinical practice. *Diabetología* (46): 733–749
- Taiz L. y Zeiger E. 2002. Plant Physiology. *Sunderland: Sinauer* 3ª edición
- Valko M., Morris H. y Cronin M. T. D. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161-1208
- Yüce A., Ahmet AteSSahin A., ÇeribaSi A. O. y Aksakal M. 2007. Ellagic Acid Prevents Cisplatin-Induced Oxidative Stress in Liver and Heart Tissue of Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* (101): 345–349
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J. y Qian M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts *J Agric Food Chem* 50(6):1619-24.

- Zhang L., Yang J., Chen X., Zan K., Wen X., Chen H. y Wang Q. 2010. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology* (132): 518-524
- Zhu M., Dong X. y Guo M. 2015. Phenolic Profiling of *Duchesnea indica* Combining Macroporous Resin Chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules* (20): 22463–22475