



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“EFECTO HIPOGLUCÉMICO, HIPOLIPIDÉMICO Y  
ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE  
*Eryngium carlinae* EN RATAS DIABÉTICAS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGA**

**PRESENTA:  
DIANA GARCIA CERRILLO**

**ASESOR:  
DOCTOR EN CIENCIAS ALFREDO SAAVEDRA MOLINA**

**CO-ASESORA:  
DOCTORA EN CIENCIAS RUTH NORIEGA CISNEROS**



**MORELIA, MICHOACÁN, MAYO DE 2017**

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN.....                                                                        | 1  |
| 2. ABSTRACT.....                                                                       | 2  |
| 3. INTRODUCCIÓN.....                                                                   | 3  |
| 3.1 DIABETES MELLITUS.....                                                             | 4  |
| 3.1.1 Clasificación etiológica de la DM y anomalías en el metabolismo de glucosa ..... | 5  |
| 3.1.2 Mecanismos fisiopatológicos de la DM tipo 2 .....                                | 6  |
| 3.1.3 Diagnóstico.....                                                                 | 7  |
| 3.1.4 Asociación de DM y enfermedades cardiovasculares .....                           | 7  |
| 3.2 MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA.....                                                      | 9  |
| 3.2.1 Disfunción ventricular .....                                                     | 10 |
| 3.2.2 Disfunción diastólica.....                                                       | 11 |
| 3.2.3 Disfunción sistólica.....                                                        | 11 |
| 3.3 CORAZÓN .....                                                                      | 11 |
| 3.3.1 Localización del corazón .....                                                   | 11 |
| 3.3.2 Morfología.....                                                                  | 12 |
| 3.3.3 Corazón derecho .....                                                            | 14 |
| 3.3.4 Corazón izquierdo .....                                                          | 14 |
| 3.3.5 Aurículas y ventrículos .....                                                    | 15 |
| 3.3.6 Metabolismo del corazón sano .....                                               | 15 |
| 3.3.7 Disfunción metabólica en el corazón diabético.....                               | 19 |
| 3.3.8 Memoria metabólica .....                                                         | 22 |
| 3.4 MITOCONDRIA.....                                                                   | 23 |
| 3.4.1 Organización y función de la mitocondria .....                                   | 24 |
| 3.4.2 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa .....                              | 29 |
| 3.4.3 Producción de especies reactivas de oxígeno.....                                 | 34 |
| 3.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO .....                                               | 34 |
| 3.5.1 Especies reactivas de oxígeno .....                                              | 35 |
| 3.5.2 Especies reactivas de nitrógeno .....                                            | 36 |
| 3.5.3 Efectos de las ROS y RNS sobre las macromoléculas biológicas .....               | 37 |
| 3.5.4 Sistemas de defensa antioxidante .....                                           | 40 |

|        |                                                                    |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6    | PLANTAS MEDICINALES .....                                          | 42 |
| 3.6.1  | Plantas medicinales con actividad antioxidante.....                | 43 |
| 3.6.2  | Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante.....             | 43 |
| 3.6.3  | <i>Eryngium</i> L. ....                                            | 44 |
| 3.6.4  | <i>Eryngium carlinae</i> F. Delaroche .....                        | 45 |
| 4.     | JUSTIFICACIÓN.....                                                 | 48 |
| 5.     | HIPÓTESIS.....                                                     | 48 |
| 6.     | OBJETIVOS.....                                                     | 48 |
| 6.1    | Objetivo general .....                                             | 48 |
| 6.2    | Objetivos específicos .....                                        | 48 |
| 7.     | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                         | 49 |
| 7.1    | Reactivos .....                                                    | 49 |
| 7.2    | Preparación del extracto .....                                     | 49 |
| 7.3    | Material biológico .....                                           | 49 |
| 7.4    | Inducción de diabetes mellitus experimental.....                   | 49 |
| 7.5    | Diseño experimental .....                                          | 50 |
| 7.6    | Métodos .....                                                      | 50 |
| 7.6.1  | Parámetros bioquímicos en suero .....                              | 50 |
| 7.6.2  | Determinación de lipoperoxidación en suero.....                    | 52 |
| 7.6.3  | Aislamiento y purificación de mitocondrias de corazón de rata..... | 53 |
| 7.6.4  | Determinación de proteína mitocondrial .....                       | 55 |
| 7.6.5  | Determinación de la concentración de óxido nítrico .....           | 55 |
| 7.6.6  | Determinación de la lipoperoxidación mitocondrial .....            | 56 |
| 7.6.7  | Determinación de glutatión reducido mitocondrial .....             | 56 |
| 7.6.8  | Medición de la actividad de la superóxido dismutasa.....           | 57 |
| 7.6.9  | Histología.....                                                    | 59 |
| 7.6.10 | Análisis estadístico.....                                          | 60 |
| 8.     | RESULTADOS .....                                                   | 61 |
| 8.1    | Peso de los especímenes.....                                       | 61 |
| 8.2    | Glucemia durante el tratamiento.....                               | 62 |
| 8.3    | Determinación de glucosa en suero .....                            | 63 |
| 8.4    | Determinación de colesterol total .....                            | 64 |

|      |                                                                                        |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8.5  | Determinación de triglicéridos .....                                                   | 65 |
| 8.6  | Determinación de lipoperoxidación en suero .....                                       | 66 |
| 8.7  | Determinación del óxido nítrico mitocondrial.....                                      | 67 |
| 8.8  | Determinación de lipoperoxidación mitocondrial .....                                   | 68 |
| 8.9  | Determinación de glutatión reducido mitocondrial.....                                  | 69 |
| 8.10 | Medición de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial..... | 70 |
| 8.11 | Histología .....                                                                       | 71 |
| 9.   | DISCUSIÓN.....                                                                         | 75 |
| 10.  | RESUMEN DE RESULTADOS.....                                                             | 80 |
| 11.  | PERSPECTIVAS.....                                                                      | 81 |
| 12.  | CONCLUSIÓN .....                                                                       | 81 |
| 13.  | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                        | 82 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Localización del corazón en el tórax.....                                                                                                                                                                       | 12 |
| <b>Figura 2.</b> Cara anterior del corazón y estructuras que la conforman.....                                                                                                                                                   | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Cara posterior del corazón .....                                                                                                                                                                                | 13 |
| <b>Figura 4.</b> Localización de las aurículas, válvulas y ventrículos cardiacos. ....                                                                                                                                           | 15 |
| <b>Figura 5.</b> Metabolismo oxidativo en condiciones fisiológicas de la célula cardiaca .....                                                                                                                                   | 19 |
| <b>Figura 6.</b> Estructura de la mitocondria .....                                                                                                                                                                              | 25 |
| <b>Figura 7.</b> Metabolismo en la matriz mitocondrial .....                                                                                                                                                                     | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Reacciones de la glucólisis.....                                                                                                                                                                                | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Oxidación de los ácidos grasos .....                                                                                                                                                                            | 28 |
| <b>Figura 10.</b> Descarboxilación oxidativa del piruvato.....                                                                                                                                                                   | 28 |
| <b>Figura 11.</b> Ciclo del ácido cítrico. ....                                                                                                                                                                                  | 29 |
| <b>Figura 12.</b> Flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria. ....                                                                                                                                  | 32 |
| <b>Figura 13.</b> Teoría quimiosmótica de la fosforilación oxidativa. ....                                                                                                                                                       | 33 |
| <b>Figura 14.</b> Esquema de la lipoperoxidación. ....                                                                                                                                                                           | 39 |
| <b>Figura 15.</b> Planta de <i>Eryngium carlinae</i> mostrando sus inflorescencias. ....                                                                                                                                         | 46 |
| <b>Figura 16.</b> Secuencia de la reacción llevada a cabo para la determinación de glucosa en suero.....                                                                                                                         | 51 |
| <b>Figura 17.</b> Secuencia de la reacción llevada a cabo para la determinación de colesterol en suero.....                                                                                                                      | 51 |
| <b>Figura 18.</b> Secuencia de la reacción llevada a cabo para la determinación de triglicéridos en suero.....                                                                                                                   | 52 |
| <b>Figura 19.</b> Formación del aducto MDA-TBA. ....                                                                                                                                                                             | 53 |
| <b>Figura 20.</b> Determinación indirecta del óxido nítrico.....                                                                                                                                                                 | 55 |
| <b>Figura 21.</b> Principio del kit de determinación de SOD. ....                                                                                                                                                                | 58 |
| <b>Figura 22.</b> Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo control sin tratamiento.....                                                                         | 71 |
| <b>Figura 23.</b> Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo control tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> . ....   | 72 |
| <b>Figura 24.</b> Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo control tratado a una concentración de 3 mg/kg del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> . ....    | 72 |
| <b>Figura 25.</b> Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo diabético sin tratamiento. ....                                                                      | 73 |
| <b>Figura 26.</b> Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> . .... | 73 |
| <b>Figura 27.</b> Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo diabético tratado a una concentración de 3 mg/kg del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> . ....  | 74 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Plantas con propiedades hipoglucemiantes.....                                                     | 44 |
| <b>Tabla 2.</b> Compuestos identificados en el extracto hexánico de la inflorescencia de <i>E. carlinae</i> ..... | 47 |

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfica 1.</b> Gráfica representativa del peso de los especímenes en tratamiento .....                                                                                                                  | 61 |
| <b>Gráfica 2.</b> Gráfica representativa de la concentración de glucosa de los especímenes durante el tratamiento.....                                                                                     | 62 |
| <b>Gráfica 3.</b> Gráfica de la concentración de glucosa en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento.....                                                                                   | 63 |
| <b>Gráfica 4.</b> Gráfica de los niveles de colesterol total en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> ..... | 64 |
| <b>Gráfica 5.</b> Gráfica de los niveles de triglicéridos en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> .....    | 65 |
| <b>Gráfica 6.</b> Gráfica de los niveles de lipoperoxidación en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> ..... | 66 |
| <b>Gráfica 7.</b> Gráfica de los niveles de óxido nítrico mitocondrial a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> .....                                                  | 67 |
| <b>Gráfica 8.</b> Gráfica de los niveles de lipoperoxidación mitocondrial a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> .....                                               | 68 |
| <b>Gráfica 9</b> Gráfica de los niveles de glutatión reducido (GSH) mitocondrial de los especímenes en tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> .....      | 69 |
| <b>Gráfica 10.</b> Gráfica de la actividad de la enzima SOD mitocondrial de los especímenes en tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de <i>E. carlinae</i> .....              | 70 |

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C: Grados centígrados

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : Oxígeno singlete

4-HNE: 4-hidroxinonenal

ABTS: Radicales 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFIP: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América

AGP: Ácido graso poliinsaturado

AMP: Monofostato de adenosina

AMPK: Enzima proteína cinasa activada por AMP

AO: Antioxidantes

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ATP: Trifosfato de adenosina

Ca: Calcio

CO: Monóxido de carbono

CTE: Cadena de transporte de electrones

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial

DM: Diabetes mellitus

DOC\*: Desoxicolato de sodio

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo y

DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)

EAC: Enfermedad arterial coronaria

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EDIC: Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications

EGTA: Ácido etilenbis (oxietilnitrilo) tetracético

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

FABPpm: Proteína que une ácidos grasos de la membrana plasmática

FADH<sub>2</sub>: Dinucleótido de flavina y adenina

FAT/CD36: Enzima translocasa de ácidos grasos

FATP1 y FATP6: Proteínas transportadoras de ácidos grasos

Fe: Hierro

Fe-S: Centros ferro-sulfurados

FMN: flavina mononucleótido oxidado

g: Gramo

GLUTs: Proteínas de membrana encargadas de la captación de glucosa por el cardiomiocito.

GPx: Glutación peroxidasa

GRs: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

h: Horas

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico

HClO<sub>4</sub>: Ácido perclórico

HDL: Lipoproteína de alta densidad, por sus siglas en inglés

Hepes: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HK: Enzima hexocinasa

IAM: Infarto agudo al miocardio

IC: Insuficiencia cardiaca

IIQB: Instituto de Investigaciones Químico- Biológicas

INSP: Instituto Nacional de Salud Pública

KCl: Cloruro de potasio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de potasio monobásico

LCFAaCoA: Acil-coenzima A de cadena larga

LDL: Lipoproteína de baja densidad, por sus siglas en inglés

MCD: Miocardiopatía diabética

MDA: Malondialdehído

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio

Mo: Molibdeno

MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico

MTC: Medicina Tradicional Complementaria

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Trióxido de dinitrógeno

N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: Tetróxido de dinitógeno

NAD: Nicotinamida adenindinucleótido oxidado

NADH: Nicotinamida adenindinucleótido

NaNO<sub>2</sub>: Nitrito de sodio

NED: N- naftiletilendiamina

Nm: Nanómetros

NO: Óxido nítrico

NO<sub>2</sub>: Dióxido de nitrógeno

NOS: óxido nítrico sintasas

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido

O<sub>3</sub>: Ozono

OH: Radical hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO<sup>-</sup>: Anión peroxinitrito

PDH: Enzima piruvato deshidrogenasa

PDK 1-4, PDKs: Enzimas piruvato deshidrogenasa cinasas 1-4

PFA: Paraformaldehído

PFK: Enzima fosfofructocinasa

Pi: Grupo fosfato inorgánico

PPARα: Receptor activado por la proliferación del peroxisoma α

Q: Coenzima Q, o ubiquinona

QH<sub>2</sub>: Ubiquinol

RNS: Especies reactivas de nitrógeno, por sus siglas en ingles

RO: Radical alcoxilo

ROO: Radical peroxilo



ROS: Especies reactivas de oxígeno,  
por sus siglas en inglés

Rpm: Revoluciones por minuto

SOD: Superóxido dismutasa

β: Beta

STZ: Estreptozotocina

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al TBA,  
por sus siglas en inglés

TII: Terapia intensiva con insulina

TNB: Dianión 2-nitro-5-tiobenzoato

TX100: Tensioactivo Triton X-100

VCl<sub>3</sub>: Cloruro de vanadio

VLDL: Lipoproteínas de muy baja  
densidad, por sus siglas en inglés

WST: water soluble tetrazolium salt, 2-  
(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-  
disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal  
monosódica

XO: Enzima xantina oxidasa

μ: Micro

## 1. RESUMEN

La Diabetes mellitus (DM) es un grupo de desórdenes del metabolismo de carbohidratos en donde la glucosa no se utiliza eficientemente y es producida en exceso, dando como resultado hiperglucemia, que es su característica principal, debido a insuficiencia en la acción de la insulina. La DM es un problema de salud mundial; en México, desde el año 2000 ocupa el primer lugar como causa de muerte general. La DM y sus complicaciones constituyen poderosos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. Los adultos con DM son de 2 a 4 veces más susceptibles a sufrir enfermedades del corazón, que los adultos sin diabetes. La miocardiopatía diabética (MCD) es una complicación ocasionada por la diabetes y es específica de ésta. Se caracteriza por la presencia de disfunción ventricular izquierda. Estudios previos han demostrado que la hiperglucemia, hiperlipidemia, inflamación, apoptosis y el estrés oxidativo, probablemente están involucrados en la fisiopatología de la MCD. El daño al corazón diabético está íntimamente relacionado con la disfunción mitocondrial. Las mitocondrias disfuncionales pueden generar mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y desatar factores que favorecen la muerte de los cardiomiocitos. Diversos agentes que contrarrestan las ROS o los antioxidantes, pueden tener la capacidad de atenuar el daño al corazón diabético en modelos animales experimentales. *Eryngium carlinae* (*E. carlinae*) se conoce comúnmente en México como “Hierba del Sapo” y es utilizada en la medicina tradicional para diversos tipos de enfermedades. Su extracto etanólico ha demostrado poseer propiedades antioxidantes *in vitro* e hipolipidémicas *in vivo*; además, el extracto hexánico de la planta ha demostrado poseer capacidad antioxidante *in vitro*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar, en el suero de ratas diabéticas, la capacidad hipoglucemiante e hipolipemiante del extracto hexánico de *E. carlinae*, a través de la determinación los parámetros bioquímicos: colesterol total, triglicéridos y glucosa, mediante métodos espectrofotométricos, y la capacidad antioxidante del extracto mediante la cuantificación de los niveles de lipoperoxidación. Además, en las mitocondrias del ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes, se determinó la capacidad antioxidante del extracto a través de la determinación de los niveles de óxido nítrico (NO), lipoperoxidación, glutatión y medición de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunado a lo anterior, se realizó un análisis histológico del ventrículo izquierdo del corazón de dichos especímenes. En conclusión, el extracto hexánico de la inflorescencia de *E. carlinae* posee capacidad hipoglucemiante, hipolipemiante y antioxidante en el suero de ratas diabéticas, así como un posible efecto protector histológico en el ventrículo izquierdo del corazón de ratas diabéticas. El extracto no posee actividad antioxidante en mitocondrias del ventrículo izquierdo de corazón de ratas diabéticas.

**Palabras clave:** Diabetes, hierba del sapo, hipoglucemiante, hipolipemiante, corazón

## 2. ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of disorders of carbohydrate metabolism in which glucose is not used efficiently and is produced in excess, resulting in hyperglycemia, which is its main characteristic, due to insufficient insulin action. DM is a global health problem; In Mexico, since the year 2000 occupies the first place as general cause of death. DM and its complications are powerful risk factors for cardiovascular diseases. Adults with DM are 2 to 4 times more susceptible to heart disease than adults without diabetes. Diabetic cardiomyopathy (DCM) is a complication caused by diabetes and is specific to it. It is characterized by the presence of left ventricular dysfunction. Previous studies have shown that hyperglycemia, hyperlipidemia, inflammation, apoptosis and oxidative stress are probably involved in the pathophysiology of DCM. Diabetic heart damage is closely related to mitochondrial dysfunction. Dysfunctional mitochondria may generate increased production of reactive oxygen species (ROS) and trigger factors that favor the death of cardiomyocytes. Several agents that counteract ROS or antioxidants may have the ability to attenuate damage to the diabetic heart in experimental animal models. *Eryngium carlinae* (*E. carlinae*) is commonly known in Mexico as "Hierba del sapo", and is used in traditional medicine for various types of diseases. Its ethanolic extract has been shown to possess antioxidant properties *in vitro* and hypolipidemic *in vivo*; In addition, the hexane extract of the plant has been shown to possess antioxidant capacity *in vitro*. The aim of the present study was to evaluate the hypoglycaemic and hypolipidemic capacity of the hexanic extract of *E. carlinae* in the serum of diabetic rats by determining the biochemical parameters: total cholesterol, triglycerides and glucose by spectrophotometric methods. Antioxidant capacity of the extract by quantifying the levels of lipoperoxidation. In addition, in the left ventricle mitochondria of the heart of the specimens, the antioxidant capacity of the extract was determined through the determination of nitric oxide (NO) levels, lipoperoxidation, glutathione and measurement of the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD). In addition to the above, a histological analysis of the left ventricle of the heart of these specimens was performed. In conclusion, the hexanic extract of the inflorescence of *E. carlinae* possesses hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant capacity in the serum of diabetic rats, as well as a possible histological protective effect in the left ventricle of the heart of diabetic rats. The extract does not possess antioxidant activity in the heart's left ventricle mitochondria of diabetic rats.

**Keywords:** Diabetes, hierba del sapo, hipoglucemiante, hipolipemiente, corazón.

### 3. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica cuya frecuencia y prevalencia han aumentado significativamente en las últimas décadas. La DM tipo 2 representa casi el 90% de todos los casos. La Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2025 existirán 300 millones de pacientes diabéticos, lo que representa el 5.4% de la población mundial [Luna *et al.*, 2011].

La DM y sus complicaciones constituyen poderosos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (ECV) [Luna *et al.*, 2011], acompañado de la propia intolerancia a la glucosa y la obesidad. La vasculopatía diabética se asocia con disfunción endotelial y deterioro de la función vascular a través de mecanismos, que involucran la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, como se observa tanto en seres humanos como en modelos experimentales [Vallejo *et al.*, 2014]. Según las estadísticas, existe una fuerte correlación entre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la DM: al menos, el 68% de las personas diabéticas mayores de 65 años mueren de enfermedades cardíacas y el 16% de apoplejía. Los adultos con DM son de 2 a 4 veces más susceptibles a sufrir enfermedades del corazón o apoplejías que los adultos sin diabetes, aun cuando la enfermedad está controlada. Las personas con DM, particularmente con diabetes tipo 2, pueden poseer las siguientes condiciones que contribuyen al riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares:

- Hipertensión, reconocida como el mayor riesgo para enfermedades cardiovasculares. En pacientes que poseen ambas condiciones, hipertensión y diabetes, el riesgo se incrementa al doble.
- Síndrome metabólico, caracterizado por altos niveles de colesterol-LDL (lipoproteínas de baja densidad, por sus siglas en inglés) y triglicéridos, así como niveles bajos de colesterol-HDL (lipoproteínas de alta densidad, por sus siglas en inglés).
- Obesidad, que es también un riesgo mayor para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y está fuertemente relacionada con resistencia a la insulina.
- Falta de actividad física.

El corazón de las personas con diabetes muestra alteraciones anatómicas y funcionales específicas como una mayor masa muscular, la prolongación del período de pre-eyección, el acortamiento del tiempo de eyección, la reducción de la función sistólica del ventrículo izquierdo, así como una menor fracción de eyección en respuesta al ejercicio por disminución de la reserva cardíaca. También se cita una mayor rigidez de las arterias [Torres- Herrera, 2012].

Los cambios miocárdicos originados por la DM, luego de excluida la cardiopatía isquémica, la hipertensión arterial u otras causas conocidas de cardiopatía, conforman la cardiomiopatía diabética (MCD), en cuya patogenia se involucran varios factores: alteración de la circulación coronaria estructural y funcional, trastornos en el metabolismo del calcio, deficiente utilización de la glucosa por los miocitos cardíacos, y menor respuesta a las catecolaminas [Torres- Herrera, 2012].

El daño al corazón diabético está íntimamente relacionado con disfunción mitocondrial así como incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno [Liang & Kobayashi, 2015]. Además del estrés oxidativo, otros mecanismos participan en la vasculopatía diabética, incluyendo la resistencia a la insulina e incrementando la inflamación vascular y sistémica. En este contexto, se ha incrementado la evidencia que fundamenta la participación de citocinas pro-inflamatorias en el desarrollo de enfermedades vasculares, como la aterosclerosis y la vasculopatía diabética [Vallejo *et al.*, 2014]. Estos factores actúan entre sí, y generan finalmente la muerte del cardiomiocito.

El daño mitocondrial consistente observado en el corazón diabético indica una falla en su control de calidad. Las mitocondrias disfuncionales pueden generar mayor producción de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés) y desatar factores que favorecen la muerte de los cardiomiocitos como el citocromo c, factor inductor de apoptosis y Smac/DIABLO. Diversos agentes que contrarrestan las ROS o los antioxidantes, pueden tener la capacidad de reducir la muerte de los cardiomiocitos y atenuar el daño al corazón diabético en modelos animales experimentales [Liang & Kobayashi, 2015].

El suministro externo de antioxidantes puede contrarrestar el efecto de dichas especies, y a su vez, prevenir la aparición de muchas enfermedades subyacentes. Las fuentes naturales de antioxidantes pueden ser más seguras de usar respecto a los antioxidantes sintéticos, debido a una menor toxicidad y efectos secundarios [Choo & Yong, 2011].

### **3.1 DIABETES MELLITUS**

La Diabetes Mellitus es un grupo de desórdenes del metabolismo de carbohidratos en donde la glucosa no se utiliza eficientemente y es producida en exceso, dando como resultado hiperglucemia [Sacks *et al.*, 2011], que es su característica principal, debido a insuficiencia en la acción de la insulina. Su patogénesis involucra tanto factores genéticos como ambientales y nutricionales [Seino *et al.*, 2010].

### 3.1.1 Clasificación etiológica de la DM y anomalías en el metabolismo de glucosa

- I. Tipo 1, conocida también como diabetes insulino-dependiente o diabetes juvenil, debida a la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, usualmente conduciendo a deficiencia absoluta de insulina.
  - A. Autoinmune
  - B. Idiopática
- II. Tipo 2, conocida como diabetes no insulino-dependiente y el tipo que se presenta con mayor frecuencia, que va desde defectos en la secreción de insulina hasta resistencia a la misma con diversos grados de defecto en su secreción.
- III. Debido a otros mecanismos o enfermedades específicas:
  - A. Aquellas en las que mutaciones específicas han sido identificadas como una causa de susceptibilidad genética, ya sea por anomalías genéticas en la función de las células  $\beta$  pancreáticas o por anomalías genéticas en la acción de la insulina.
  - B. Aquellas asociadas con otras enfermedades o condiciones, como enfermedades del páncreas exócrino, padecimientos endócrinos, enfermedades del hígado, por inducción química, por infecciones, padecimientos autoinmunes o por síndromes genéticos asociados a la diabetes.
- IV. DM Gestacional, más parecida a la tipo 2 que a la tipo 1. Se desarrolla en promedio en el 7% del total de embarazos y suele remitir al terminar el embarazo, pero constituye un factor de riesgo mayor para desarrollar DM tipo 2 en etapas posteriores en la vida [Seino *et al.*, 2010].

Según las estimaciones, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980 [OMS, 2016], lo que implica que el número de personas con diabetes aumentó casi cuatro veces en tan sólo tres décadas, y se espera que esta cifra se incremente a 592 millones en 2035 [Tayyab *et al.*, 2016]. La prevalencia mundial de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4.7% al 8.5% en la población adulta. Ello supone también un incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso o la obesidad. En la última década, la prevalencia de la diabetes ha aumentado más en los países de ingresos bajos y medianos, que en los países de ingresos altos. En 2012, la diabetes

provocó 1.5 millones de muertes. Un nivel de glucosa en la sangre superior al deseable, provocó otros 2.2 millones de muertes al incrementar los riesgos de enfermedades cardiovasculares y de otro tipo. Un 43% de estos 3.7 millones de muertes ocurren en personas con menos de 70 años [OMS, 2016].

En México, desde el año 2000, la diabetes ocupa el primer lugar como causa de muerte general [Rojas *et al.*, 2015]. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de medio camino, 2016, identifican al 9.4% de los adultos en México diagnosticados con diabetes, observándose un incremento en la prevalencia con respecto a la ENSANUT 2012 (9.2%) y a la ENSANUT 2006 (7.2%). Sin embargo, el total de adultos con diabetes podría ser mayor por el porcentaje de los diabéticos que no conocen su condición.

El desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico y la pérdida de calidad de vida para quienes padecen diabetes y sus familias, así como por los importantes recursos que requieren en el sistema público de salud para su atención [Hernández, 2013]. Los costos directos e indirectos del tratamiento de la DM son elevados. Con una estimación de los casos esperados de diabetes en 2010, investigaciones del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), encontraron que los mayores costos directos corresponden a medicamentos (más de 133 mdp), seguidos de los costos por complicaciones (más de 110 mdp), costos por consulta/diagnóstico (más de 59 mdp) y por hospitalización (alrededor de 40 mdp). Los mayores costos directos los realizan los propios usuarios, seguido por instituciones de seguridad social. Con respecto a los costos indirectos, el mayor costo lo tiene la discapacidad permanente (más de 400 mdp), seguida por los costos debidos a la mortalidad prematura (casi 20 mdp) y por los costos por discapacidad temporal (alrededor de 6 mdp). También, en este caso, la mayor carga por costos indirectos corresponde al usuario [Rojas *et al.*, 2015]. Esta inversión, de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, se relaciona directamente con la tasa de mortalidad por esta causa [Hernández, 2013]. Los altos costos de la diabetes son atribuibles al cuidado tanto de las condiciones agudas, como la hipoglucemia y la cetoacidosis, y de las complicaciones debilitantes. Estas últimas incluyen complicaciones tanto microvasculares, predominantemente retinopatía, nefropatía y neuropatía; como macrovasculares, en particular accidente cerebrovascular y cardiopatía isquémica. En conjunto, estas condiciones hacen de la diabetes la cuarta causa de muerte en el mundo [Sacks *et al.*, 2011].

### 3.1.2 Mecanismos fisiopatológicos de la DM tipo 2

La DM se considera una enfermedad heterogénea con diversos efectos sistémicos y mecanismos involucrados. La DM tipo 2 es una consecuencia de un desbalance entre la sensibilidad de los tejidos a la insulina y/o la producción de esta hormona por las células  $\beta$  del páncreas. Uno de los primeros signos de la DM es la

intolerancia a la glucosa debida a la resistencia al efecto de la insulina de los tejidos periféricos particularmente el hígado, el tejido graso y el músculo esquelético. Esta resistencia a la insulina es inicialmente compensada por una secreción aumentada de esta hormona por las células  $\beta$ . Dependiendo de la plasticidad de estas células, el estado hiperinsulinémico podría sostenerse indefinidamente, o bien podría desarrollarse disfunción de estas células pancreáticas que podría llevar a disminuir su secreción (hipoinsulinemia), lo que llevaría a hiperglucemia y finalmente, a DM dependiente de insulina [Luna *et al.*, 2011].

### 3.1.3 Diagnóstico

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la DM, se establece el diagnóstico de prediabetes cuando la glucosa de ayuno es igual o mayor a 100 mg/dl y menor o igual de 125 mg/dL (Glucosa Anormal de Ayuno) y/o cuando la glucosa dos horas post carga oral de 75 g de glucosa anhidra es igual o mayor a 140 mg/dL y menor o igual de 199 mg/dL (Intolerancia a la Glucosa).

Se establece el diagnóstico de diabetes si se cumple cualquiera de los siguientes criterios: presencia de síntomas clásicos y una glucemia plasmática casual mayor o igual a 200 mg/dL; glucemia plasmática en ayuno mayor o igual a 126 mg/dL; o bien glucemia mayor a 200 mg/dL a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua, sin olvidar que en la prueba de ayuno o en la prueba de tolerancia oral a la glucosa, o en ausencia de síntomas inequívocos de hiperglucemia, estos criterios se deben confirmar repitiendo la prueba un día diferente [NOM 015].

Una serie de factores aumenta el riesgo de desarrollar diabetes. Además de factores de índole étnica y genética, la edad y la historia familiar, un índice de masa corporal aumentado, el tabaquismo, el sedentarismo, una dieta pobre en fibras y grasas poliinsaturadas y rica en hidratos de carbono, la obesidad abdominal y la presencia de resistencia a la insulina, son marcadores de riesgo incrementado de tornarse diabético. Las complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía, principalmente), se relacionan con el grado de hiperglucemia y se pueden manejar si se hace un control adecuado de la glucosa. Las complicaciones macrovasculares (accidente cerebrovascular y cardiopatía isquémica, predominantemente), son las causas mayores de morbilidad [Thierier, 2006].

### 3.1.4 Asociación de DM y enfermedades cardiovasculares

Las complicaciones cardiovasculares representan la causa principal de hospitalización y muerte de los pacientes diabéticos [Al-Rasheed *et al.*, 2016].

La mortalidad total por enfermedad arterial coronaria (EAC) en personas con DM tipo 2 sin un infarto previo, es tan alta como la de los individuos no diabéticos



que ya sufrieron de un infarto agudo al miocardio (IAM). La DM multiplica por cuatro el riesgo de muerte de causa cardiovascular. El estudio retrospectivo de diabetes en el Reino Unido determinó que el riesgo a 10 años de complicaciones macrovasculares fue cuatro veces mayor que el riesgo de complicaciones microvasculares. El riesgo de enfermedades cardiovasculares se multiplica por doce cuando el paciente diabético tiene ya enfermedad coronaria [Luna *et al.*, 2011].

La vasculopatía diabética se asocia con disfunción endotelial y deterioro de la función vascular a través de mecanismos que involucran la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, como se observa tanto en seres humanos como en modelos experimentales. Además del estrés oxidativo, otros mecanismos participan en la vasculopatía diabética, entre ellos: la resistencia a la insulina y el incremento en la inflamación sistémica y vascular [Vallejo *et al.*, 2014].

¿Cuál es la relación que existe entre enfermedad coronaria y DM? La mayor parte de los factores de riesgo para enfermedad coronaria están mucho más presentes en los pacientes diabéticos tipo 2 que en los no diabéticos. Sin embargo, los factores de riesgo tradicionales -hipertensión, síndrome metabólico, obesidad y falta de actividad física- son responsables de sólo el 25% al 50% de aumento del riesgo de coronariopatía que se ve en los pacientes diabéticos [Therier, 2006].

La aterosclerosis es un complejo proceso que afecta al endotelio, el músculo liso vascular y las plaquetas. La diabetes es responsable de una serie de cambios en cada uno de estos componentes de la pared del vaso, que favorece la aparición de enfermedad aterosclerótica. Los mecanismos por los cuales la diabetes potencia el fenómeno aterosclerótico, tienen que ver con la alteración del perfil lipídico y el metabolismo hidrocarbonado. La insulinoresistencia, la hiperglucemia y el aumento de los ácidos grasos libres en la DM tipo 2, generan disfunción endotelial, paso inicial de la aterosclerosis, al disminuir la producción de óxido nítrico y aumentar la formación de radicales libres, con incremento del estrés oxidativo [De Vriese, 2000].

En la diabetes tipo 2 y en la insulinoresistencia, al estar disminuido el efecto antilipolítico de la insulina, aumenta el acceso de ácidos grasos libres al músculo esquelético y el hígado, lo cual favorece la dislipidemia. La disminución en la actividad de la lipoproteína lipasa favorece la formación de partículas pequeñas y densas de LDL que están más propensas a ser oxidadas. Las proteínas LDL oxidadas, generan la formación de moléculas proinflamatorias, incluidas moléculas de adhesión, disminuyen la formación de óxido nítrico y, por lo tanto, favorecen la disfunción endotelial [Therier, 2006].

Debido a la disminución del óxido nítrico, el aumento de los niveles de endotelina I, angiotensina II y activación simpática, los diabéticos presentan alteración en la función del músculo liso vascular. La angiotensina II genera incremento del estrés oxidativo y junto con la hipertensión arterial, contribuye al desarrollo de lesiones fibrosas. Finalmente, las LDL oxidadas y la hiperglucemia pueden favorecer el desarrollo de apoptosis en el músculo liso vascular y promover

la aterosclerosis. Las placas ateroscleróticas de los diabéticos son más susceptibles a la ruptura y, por actividad plaquetaria y coagulabilidad de la sangre incrementadas, son más propensos a la formación de trombos [Therier, 2006].

De manera, entonces, que en los diabéticos hay una serie de factores que favorecen el desarrollo de aterosclerosis acelerada, placas más vulnerables y, por lo tanto, más propensas a accidentarse. De allí que estos pacientes estén más expuestos a presentar síndromes coronarios agudos [Therier, 2006].

### 3.2 MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA

Más allá de la enfermedad coronaria, a nivel del músculo cardíaco en el diabético hay alteraciones que contribuyen a explicar la mayor incidencia de falla de bomba [Therier, 2006].

El corazón de las personas con diabetes muestra alteraciones anatómicas y funcionales específicas como: una mayor masa muscular, la prolongación del período de preeyección, el acortamiento del tiempo de eyección, la reducción de la función sistólica del ventrículo izquierdo, así como una menor fracción de eyección en respuesta al ejercicio por disminución de la reserva cardíaca [Torres- Herrera, 2012].

Evidencia clínica, epidemiológica e histopatológica indican la existencia de una cardiopatía específica relacionada con la DM [Ferreira-Braga *et al.*, 2005].

La miocardiopatía diabética (MCD) es una complicación ocasionada por la diabetes que se caracteriza por la presencia de disfunción ventricular izquierda. Debido a la gran variedad de enfermedades asociadas a la evolución de la diabetes, el desarrollo de la MCD no ha sido descrito plenamente. Un factor de riesgo para el desarrollo de MCD es la presencia de estenosis coronarias provocadas por la formación de placas ateroscleróticas, consecuencia de la elevación de los lípidos en la sangre y la inflamación crónica. Además, contribuyendo al desarrollo de MCD, a nivel celular se han descrito alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos, alteraciones en la homeostasis de calcio, defectos en las proteínas contráctiles, disminución de la utilización de glucosa y bajos niveles de ATP, lo anterior con consecuencias negativas en el rendimiento miocárdico [Codinach *et al.*, 2002].

Estudios previos han demostrado que la hiperglicemia, hiperlipidemia, inflamación, apoptosis y el estrés oxidativo probablemente están involucrados en la fisiopatología de la MCD. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS) derivadas de la hiperglucemia juegan un papel central en la MCD [Al-Rasheed *et al.*, 2016].

Varios mecanismos responsables de la MCD han sido propuestos:

- a) La alteración en la homeostasis del calcio intracelular, lo que lleva a la alteración de la contractilidad cardíaca.

- b) La disfunción mitocondrial, lo que lleva a un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y puede conducir incluso a la muerte celular cardíaca.
- c) El metabolismo celular anormal, lo que lleva a la acumulación de lípidos tóxicos en el corazón.
- d) La acumulación de productos finales glicosilados en el corazón, lo que lleva a la acumulación de éstos en la matriz extracelular, lo que a su vez causa disfunción diastólica y sistólica y conduce, eventualmente, a insuficiencia cardíaca.

Todos estos factores patógenos podrían contribuir a la MCD, pero todos estos factores están relacionados con el estrés oxidativo [Xu *et al.*, 2016].

La MCD ha sido caracterizada por la disfunción ventricular que se produce en la diabetes, independientemente de las enfermedades asociadas a ésta [Xia *et al.*, 2012]. La inflamación crónica está asociada al incremento de los niveles de citocinas y células de adhesión, tanto en tejido cardíaco como en suero, lo que conduce a cambios estructurales [Kim *et al.*, 2010]. A medida que la enfermedad progresa, la hipertrofia ventricular izquierda aparece como consecuencia de la hipertrofia de los cardiomiocitos. Inicialmente se manifiesta como disfunción diastólica asintomática, más tarde disfunción sistólica y eventualmente, insuficiencia cardíaca [Xia *et al.*, 2012].

Cambios morfológicos específicos se han visto en la MCD, incluyendo hipertrofia de los miocitos y microangiopatía intramiocárdica, así como fibrosis intersticial y perivascular. La fibrosis miocárdica es un factor clave en el corazón diabético e involucra cantidades cada vez mayores de matriz extracelular, que es una característica de la remodelación miocárdica. Se ha propuesto que la hiperglucemia puede activar la acumulación de matriz extracelular y la progresión de la remodelación cardíaca y disfunción [Hou *et al.*, 2013].

Los tratamientos que pueden reducir el estrés oxidativo, o la inflamación y el estrés nitrosativo han demostrado ser eficaces en la atenuación del desarrollo de la MCD [Xia *et al.*, 2012].

### 3.2.1 Disfunción ventricular

Como en las demás miocardiopatías, la manifestación clínica de la MCD es la disfunción ventricular que puede ser diastólica, sistólica o mixta. Estudios en pacientes con DM no insulino dependientes, mostraron incremento de la masa y grosor de la pared del ventrículo izquierdo y reducción de su cavidad y función sistólica, además de un incremento de la rigidez arterial, en comparación con los pacientes no diabéticos [Codinach *et al.*, 2002].

El mayor grosor absoluto y relativo de la pared ventricular conlleva un aumento de la contractilidad ventricular si la función miocárdica es normal, manteniéndose la contractilidad cuando dicha función está ligeramente deprimida [Codinach *et al.*, 2002].

El concepto de miocardiopatía implica el desarrollo de una enfermedad del músculo cardíaco dependiente del tiempo, que incluye un periodo subclínico en el que los síntomas y signos habituales de la enfermedad están ausentes [Codinach *et al.*, 2002].

### **3.2.2 Disfunción diastólica**

Desde hace pocos años, se ha centrado la atención en la importancia de la disfunción diastólica aislada, con función sistólica intacta, como causa de insuficiencia cardíaca (IC). Se ha observado que las anomalías de la función diastólica pueden anunciar, en muchos casos, el subsiguiente deterioro progresivo de la función cardíaca. En la MCD, de forma similar, la disfunción diastólica aparecería en primer lugar en el curso de la enfermedad [Codinach *et al.*, 2002].

### **3.2.3 Disfunción sistólica**

La presencia de disfunción sistólica preclínica en pacientes diabéticos se conoce desde hace aproximadamente 25 años. Ahmed y cols. hallaron disfunción sistólica subclínica del ventrículo izquierdo en diabéticos sin signos de IC. Los autores encontraron en estos pacientes un periodo de preeyección prolongado y un tiempo de eyección del ventrículo izquierdo acortado, parámetros que se correlacionan con una fracción de eyección basal reducida [Codinach *et al.*, 2002].

## **3.3 CORAZÓN**

### **3.3.1 Localización del corazón**

El corazón está situado en el tórax por detrás del esternón y delante del esófago, la aorta y la columna vertebral. A ambos lados de él, están los pulmones. El corazón descansa sobre el diafragma, músculo que separa las cavidades torácica y abdominal [Aragoncillo, 2009].

Se encuentra dentro de una bolsa denominada pericardio. La bolsa pericárdica tiene dos hojas; una interna, sobre la superficie cardíaca y otra externa que está fijada a los grandes vasos que salen del corazón. Entre ambas hojas existe una escasa cantidad de líquido para evitar su roce cuando late. La superficie más externa del pericardio está fijada a las estructuras próximas mediante ligamentos. Así, está unido por éstos al diafragma, la columna vertebral y la pleura de ambos pulmones [Aragoncillo, 2009].



**Figura 1. Localización del corazón en el tórax.**

En el centro se encuentra el corazón, y a ambos lados los pulmones. Tomada de Aragoncillo Ballesteros, P. (2009). Anatomía del corazón. España: Editorial Nerea, S.A.

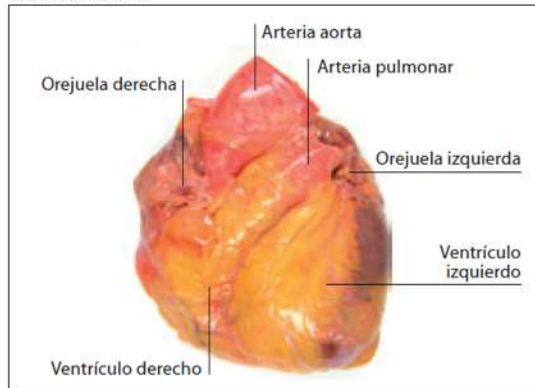
### 3.3.2 Morfología

El corazón tiene forma de cono invertido con la punta (ápex) dirigida hacia la izquierda. En la base se encuentran los vasos sanguíneos; los vasos encargados de llevar la sangre al corazón son las venas cavas superior e inferior y las venas pulmonares y los vasos que se ocupan de sacarla son la arteria pulmonar y la aorta. Las venas cavas, que recogen la sangre venosa de todo el cuerpo, desembocan en la aurícula derecha, y las venas pulmonares, que llevan la sangre oxigenada desde los pulmones, terminan en la aurícula izquierda. También se observan dos estructuras: una a la derecha de la aorta y otra a la izquierda de la arteria pulmonar; se denominan orejuelas y forman parte de las aurículas [Aragoncillo, 2009].

El corazón tiene una cara anterior, una posterior y dos bordes: derecho e izquierdo. En la superficie cardíaca se halla la grasa por la que avanzan las arterias y las venas que irrigan el corazón, es decir, las arterias coronarias, que llevan sangre al músculo cardíaco, y las venas coronarias, que la sacan [Aragoncillo, 2009].

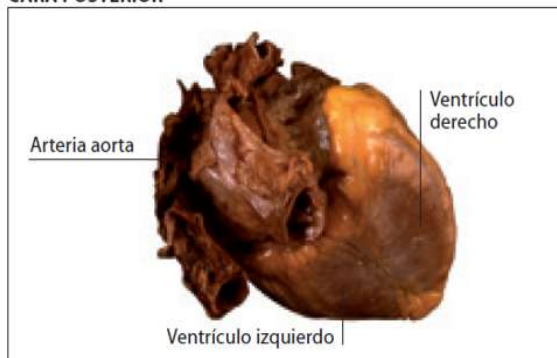
El peso del corazón varía según la edad, el tamaño y el propio peso de la persona. Así, se considera que el corazón pesa el 0.45% del peso corporal en el hombre y el 0.40% del peso corporal en la mujer, de tal modo que en un adulto de estatura media el peso del corazón oscila entre 250-350g en hombres y entre 200-300 g en mujeres [Aragoncillo, 2009].

#### CARA ANTERIOR



**Figura 2.** Cara anterior del corazón y estructuras que la conforman  
Tomada de Aragoncillo Ballesteros, P. (2009). Anatomía del corazón.  
España: Editorial Nerea, S.A.

#### CARA POSTERIOR



**Figura 3.** Cara posterior del corazón  
Tomada de Aragoncillo Ballesteros, P. (2009). Anatomía del corazón.  
España: Editorial Nerea, S.A.

La parte interna del corazón está constituida por cuatro cavidades: dos en el lado derecho y dos en el izquierdo, de ahí que sea común hablar de corazón derecho y corazón izquierdo. Las cavidades situadas en la parte superior se denominan aurículas, y las dispuestas en la parte inferior, ventrículos. En condiciones normales, las cavidades derechas no se comunican con las izquierdas, puesto que están divididas por un tabique muscular denominado tabique interauricular, que separa ambas aurículas; el tabique que distancia ambos ventrículos se llama interventricular [Aragoncillo, 2009].

### **3.3.3 Corazón derecho**

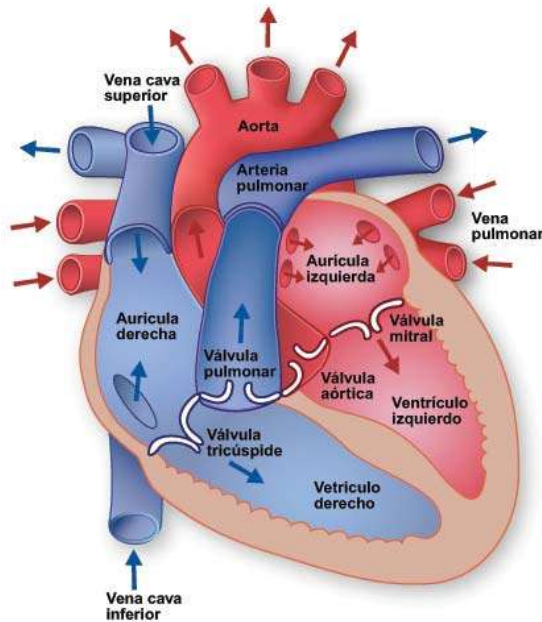
El corazón derecho consta de una aurícula en la parte superior y un ventrículo en la inferior. A la aurícula derecha llega la sangre venosa (no oxigenada) de todo el cuerpo a través de las venas cavas, que desembocan en ella. También desemboca en la aurícula derecha el seno venoso, conducto que recoge la sangre venosa del corazón [Aragoncillo, 2009].

La aurícula se comunica con el ventrículo derecho a través de una válvula, la tricúspide. Esta válvula permite el paso de sangre de la aurícula al ventrículo, pero no en sentido contrario. Cuando el corazón se contrae (sístole), la sangre sale del corazón a través de la válvula pulmonar, pasa a la arteria pulmonar y esta la lleva a los pulmones para que se oxigene [Aragoncillo, 2009].

### **3.3.4 Corazón izquierdo**

En la parte superior del corazón izquierdo se encuentra la aurícula izquierda, en la que desembocan cuatro venas pulmonares, responsables de llevar la sangre oxigenada desde los pulmones hasta el corazón [Aragoncillo, 2009].

La aurícula se comunica con el ventrículo a través de una válvula, la mitral, que permite el paso de la sangre desde la primera hasta el segundo, pero no en sentido contrario. Cuando se produce la sístole, la sangre pasa del ventrículo a la arteria aorta a través de la válvula aórtica y es distribuida por todo el organismo. En ventrículo izquierdo es más largo y estrecho que el derecho, de tal forma que la punta del corazón está formada por ese ventrículo [Aragoncillo, 2009].



**Figura 4.** Localización de las aurículas, válvulas y ventrículos cardíacos.  
Tomado de [http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy\\_Esp/anato\\_sp.cfm](http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy_Esp/anato_sp.cfm)

### 3.3.5 Aurículas y ventrículos

Las aurículas tienen las paredes finas y están constituidas, de fuera hacia dentro, por el pericardio, la hoja interna o miocardio y una capa muy fina o endocardio. Esta última reviste toda la superficie interna del corazón incluidas las válvulas, y está formada por una capa de células endoteliales, semejantes a las de los vasos sanguíneos, y fibras de colágeno y elásticas. La estructura de los ventrículos es semejante. La diferencia estriba en el grosor de la capa muscular. Mientras que el ventrículo derecho tiene un espesor de 3-4mm, el izquierdo alcanza aproximadamente los 10mm. Esta diferencia se debe a que, al expulsar la sangre durante la sístole, el ventrículo izquierdo se encuentra con una resistencia mayor: la presión arterial [Aragoncillo, 2009].

### 3.3.6 Metabolismo del corazón sano

El corazón humano produce, e inmediatamente hidroliza 30 kg de ATP diariamente, para poder llevar a cabo el bombeo diario de más de 7,000 L/día de sangre [Palomer *et al.*, 2015]. El ATP es generado predominantemente mediante fosforilación oxidativa que ocurre a nivel mitocondrial y es dependiente de oxígeno. Como consecuencia, el corazón es sumamente sensible a los cambios en la concentración de oxígeno, que se presentan en condiciones fisiológicas y patológicas. Las variaciones en la concentración de oxígeno obligan al corazón a tener una capacidad de adaptación muy eficiente. En este sentido, el corazón es



capaz de metabolizar un rango amplio de sustratos (ácidos grasos, glucosa, cuerpos cetónicos, lactato y aminoácidos), para satisfacer su demanda continua de ATP [Taegtmeyer *et al.*, 2004]. Bajo condiciones fisiológicas normales, el 90% del ATP se produce vía fosforilación oxidativa mitocondrial, el resto, a partir de otras vías metabólicas como la glucólisis [Luna *et al.*, 2011].

### 3.3.6.1 Metabolismo de los ácidos grasos

En condiciones fisiológicas, el corazón tiene la capacidad de cambiar el uso de los sustratos metabólicos para producir la energía que requiere. La preferencia por los sustratos depende de la disponibilidad de éstos y de las condiciones fisiológicas. La flexibilidad metabólica del corazón le permite maximizar la producción de ATP en función de las condiciones prevalentes, la cual es regulada por las concentraciones de sustrato, por las hormonas, la disponibilidad de oxígeno y por la carga de trabajo [Taegtmeyer *et al.*, 2004]. Dentro de esta flexibilidad metabólica, el corazón sano tiene preferencia por los ácidos grasos de cadena larga, los cuales proporcionan del 60-70% del ATP para la contracción. Los ácidos grasos pueden transportarse al corazón como ácidos grasos no esterificados unidos a la albúmina, como triglicéridos de la dieta en quilomicrones, o como triglicéridos sintetizados endógenamente unidos a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [Luna *et al.*, 2011]. Los triglicéridos exógenos y endógenos que son transportados por la sangre, deben ser primero hidrolizados por la lipoproteína lipasa, unida al endotelio para generar ácidos grasos libres que puedan moverse a través de las membranas. El corazón tiene mayor preferencia por los ácidos grasos unidos a la albúmina y por los quilomicrones que por las VLDL, lo que indica selectividad y regulación de la selección de lípidos [Hauton, 2001].

Los ácidos grasos libres cruzan pasivamente las barreras hasta llegar al sarcolema del cardiomiocito donde son transportados al interior celular predominantemente por diversos transportadores: la enzima translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36), la proteína que une ácidos grasos de la membrana plasmática (FABPpm) y las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP1 y FATP6). De estos transportadores, la FAT/CD36 puede translocarse desde vesículas intracelulares hasta el sarcolema, en respuesta a la acción de la insulina y a la enzima proteína cinasa activada por AMP (AMPK), para incrementar abruptamente las tasas de captación de ácidos grasos [Luna *et al.*, 2011]. El aumento de la captación de ácidos grasos por los cardiomiocitos inducido por la insulina es uno de sus efectos anabólicos principales. Los ácidos grasos de cadena larga una vez dentro del citosol, son esterificados al intermediario Acil-coenzima A de cadena larga (LCFAaCoA) que constituye una forma activa de los ácidos grasos. Dependiendo de la demanda metabólica del corazón, los ácidos grasos pueden entrar a la

mitocondria para su  $\beta$ -oxidación o ser esterificados dentro de la reserva de lípidos miocárdicos. La captación de ácidos grasos por la mitocondria es regulada a su vez por la enzima carnitina palmitoil tranferasa 1, la cual determina las tasas de entrada hacia la  $\beta$ -oxidación. Por su parte, la ruta de la  $\beta$ -oxidación hace que los acarreadores de hidrógeno  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (nicotinamida adenindinucleótido) y  $\text{FADH}_2$  (dinucleótido de flavina y adenina) entren a la cadena de transporte de electrones (CTE) y que las moléculas de Acetil-CoA entren al ciclo de Krebs, todo lo cual conlleva finalmente, a un aumento en la producción de ATP. Por otra parte, los cuerpos cetónicos, sintetizados a partir de ácidos grasos libres por el hígado, pueden ser metabolizados a Acetil-CoA en el corazón y entrar al ciclo de Krebs de manera similar a los ácidos grasos. Es necesario resaltar que la utilización incrementada de cuerpos cetónicos suprime la utilización de ácidos grasos y de glucosa demostrando la integración metabólica y la regulación entre un número de sustratos fisiológicos [Luna *et al.*, 2011].

### 3.3.6.2 Metabolismo de la glucosa

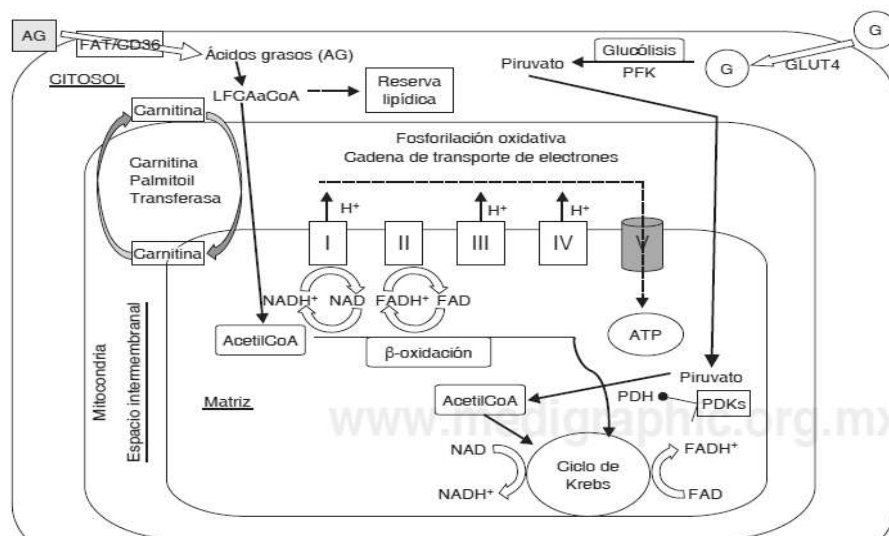
La captación de glucosa por el cardiomiocito se lleva a cabo por proteínas de membrana llamadas GLUTs. Entre ellas, el GLUT4 se transloca desde las vesículas intracelulares hasta el sarcolema para incrementar la captación de glucosa en respuesta a la estimulación por insulina y en respuesta a la activación de la enzima AMPK. La glucosa intracelular es transformada mediante una rápida fosforilación por la enzima hexocinasa (HK) y la convierte a glucosa 6 fosfato, la cual sirve como un punto central en el metabolismo, capaz de entrar a numerosas rutas que incluyen a la glucólisis y a la glucogénesis, además de las rutas biosintéticas de las pentosas fosfato y de la hexosamina. La glucólisis sólo genera pequeñas cantidades de ATP bajo condiciones independientes de oxígeno; sin embargo, es particularmente importante para la producción de energía bajo condiciones de hipoxia. El flujo de la glucólisis es regulado por la enzima fosfofructocinasa (PFK), la cual puede inhibirse (y con ello la glucólisis) por el citrato citosólico liberado del ciclo de Krebs bajo condiciones de abundancia de ATP [Luna *et al.*, 2011].

El piruvato es el producto final de la glucólisis, el cual, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, puede entrar a la mitocondria para su oxidación o puede ser reducido a lactato y reservado en el citosol. Si el piruvato entra a la mitocondria, es oxidado por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) mitocondrial, la cual lo convierte en Acetil-CoA y permite que entre al ciclo de Krebs. Por lo tanto, la PDH es un complejo enzimático clave en el metabolismo de la glucosa. La enzima PDH es regulada a su vez por otras enzimas que en general son llamadas piruvato deshidrogenasa cinasas 1-4 (PDK 1-4). Estas enzimas fosforilan a la PDH y la

inhiben. De manera similar, las PDKs son activadas por el  $\text{NADH}^+$  y la Acetil-CoA generadas cuando el estatus de energía del cardiomiocito es alto, lo que hace que no se utilice más piruvato proveniente de la glucólisis. También estas enzimas PDKs inhiben a la PDH cuando los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos son los combustibles predominantemente utilizados, disminuyendo el flujo glucolítico [Luna *et al.*, 2011].

### 3.3.6.3 Energética miocárdica

La Acetil-CoA derivada de un diverso número de sustratos, entra al ciclo de Krebs, donde es catabolizada a oxalacetato, generando aún más  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH}_2$ . Estos acarreadores de hidrógeno donan electrones a los complejos I y II de la CTE. Los electrones son lanzados a lo largo de la cadena de complejos de la membrana interna mitocondrial con el bombeo concomitante de protones dentro del espacio intermembranal, generando un gradiente electroquímico. El oxígeno es el aceptor de electrones terminal en el complejo IV y en el complejo V (la ATP sintasa) el ATP se sintetiza, facilitado por la reentrada de protones hacia la matriz mitocondrial vía el canal de protones  $\text{F}_0$ . La capacidad de producción de ATP por estos procesos y su requerimiento de oxígeno es diferente para los distintos sustratos metabólicos. Los ácidos grasos son lo que producen mayor cantidad de ATP por cada carbono de la cadena, pero requieren más oxígeno para lograrlo, además no producen ATP bajo condiciones independientes de oxígeno [Opie LH, 2004].



**Figura 5.** Metabolismo oxidativo en condiciones fisiológicas de la célula cardíaca.

Se esquematiza la membrana celular, el citosol y la mitocondria, así como los complejos de la cadena respiratoria (I-V) de la membrana interna. G= glucosa; GLUT4= Transportador de glucosa dependiente de insulina; LFCaA-CoA= AcilCoenzimaA de cadena larga; FAT/CD36= Translocasa de ácidos grasos; PDH= Piruvato deshidrogenasa; PDK= Piruvato deshidrogenasa cinasas; PFK= Fosfofructocinasa. NAD y NADH= Nicotinamida oxidada y reducida; FAD y FADH= Flavinadenosina oxidada y reducida. Tomado de Luna *et al.*, 2011.

### 3.3.7 Disfunción metabólica en el corazón diabético

El corazón tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones fisiopatológicas mediante el ajuste del metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos. La pérdida de su flexibilidad metabólica está asociada a hipertrofia e insuficiencia cardíaca [Palomer *et al.*, 2015].

En la diabetes, los niveles de sustratos y hormonas a los cuales el corazón está expuesto son anormales. Una de las manifestaciones de la resistencia a la insulina es la falla de esta hormona para suprimir a la enzima lipasa sensible a hormonas en el tejido adiposo. Esta enzima activada mantiene liberando ácidos grasos de manera continua a la circulación. Además, la insulina también falla para suprimir la secreción de VLDL en el hígado, por lo tanto, los niveles de lípidos circulantes están incrementados y exponen el corazón a concentraciones elevadas de ácidos grasos. Adicionalmente, la composición de los quilomicrones y de las VLDL se encuentra modificada. De esta manera, el corazón está expuesto a un perfil de lípidos modificado. Este perfil altera la utilización de ácidos grasos por parte del corazón [Luna *et al.*, 2011].

A pesar de la mayor velocidad de oxidación de ácidos grasos que se produce en el corazón diabético, la acumulación de lípidos en el miocardio es una característica de esta enfermedad. Los ácidos grasos pueden ser almacenados en el corazón como triacilgliceroles y fosfolípidos dentro de los cardiomiocitos, en particular cuando son abundantes, como ocurre en la diabetes o la obesidad. Si esta acumulación persiste en el tiempo, el corazón comienza a acumular intermediarios lipídicos tóxicos relacionados con el desarrollo de la resistencia a la insulina y cardiomiopatía lipotóxica. De hecho, existe una fuerte correlación entre la acumulación de lípidos intracardiacos y la insuficiencia cardíaca en seres humanos [Palomer *et al.*, 2015].

En el corazón diabético está disminuida la capacidad para transportar glucosa al interior de las fibras. Ello favorece el desarrollo de glucólisis anaeróbica con aumento en la formación de ácido láctico, lo cual lleva a acidosis intracelular con alteración en el manejo del calcio [Thierier, 2006].

Por otra parte, los cuerpos cetónicos sanguíneos están incrementados en los pacientes con DM tipo 2, con elevadas concentraciones arteriales de acetoacetato y de  $\beta$ -hidroxibutirato, lo cual correlaciona positivamente con las concentraciones plasmáticas de glucosa y ácidos grasos, además de que el aumento en la concentración de cuerpos cetónicos favorece un estado de acidosis sistémica.

Dependiendo del estado y severidad de la resistencia a la insulina y de la diabetes, el corazón podría estar crónicamente expuesto a concentraciones variantes de insulina y glucosa. La resistencia a la insulina que se presenta en el hígado y en los tejidos periféricos, particularmente en el músculo esquelético, resulta en hiperglucemia, como una consecuencia de gluconeogénesis hepática incrementada y de una disminución en la captación de glucosa tisular. Por otra parte, la concentración de insulina circulante depende de la severidad de la resistencia a la insulina y de la capacidad de las células  $\beta$  pancreáticas para aumentar la secreción de esta hormona. De esta manera, las influencias sistémicas alteran la preferencia metabólica y la tasa de utilización de sustratos en el corazón [Luna *et al.*, 2011].

### **3.3.7.1 Metabolismo de ácidos grasos en el corazón diabético**

Se ha reportado que en la mayoría de los pacientes diabéticos y en animales de experimentación, se encuentran aumentadas la captación y el metabolismo cardíaco de ácidos grasos [Hasselbaink *et al.*, 2003]. El aporte incrementado de lípidos al corazón aumenta la utilización de éste de ácidos grasos y a su vez disminuye la utilización de glucosa a través del llamado ciclo de Randle. La captación celular de glucosa disminuye porque su transportador es translocado de la membrana al citosol [Thierier, 2006]. Los ácidos grasos plasmáticos elevados

incrementan el gradiente de concentración de ácidos grasos a través de la membrana, lo que favorece su entrada. Además, los reportes parecen indicar que el cardiomiocito tiene la capacidad de adaptarse a un mayor transporte de ácidos grasos, aumentando el número de sus transportadores. En ratas diabéticas, el corazón tiene incrementados los niveles de proteínas de los transportadores de ácidos grasos FAT/CD36 y FABPpm, incrementando la capacidad total de la captación de estos sustratos. Además, los transportadores se distribuyen de manera diferente en estas condiciones de aumento de transporte, por ejemplo FAT/CD36 y FABPpm llegan a estar permanentemente localizados en el sarcolema [Luiken, 2002]. Los ácidos grasos elevados intracelularmente incrementan el flujo a través de la ruta metabólica de los ácidos grasos, lo cual, suprime la oxidación de glucosa y su utilización por el corazón. Esta desviación inicial hacia la utilización de ácidos grasos eleva la concentración de los metabolitos derivados de ácidos grasos intracelularmente. Esto constituye una señal para activar al factor de transcripción del receptor activado por la proliferación del peroxisoma  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) [Buchanan *et al.*, 2005]. La activación del PPAR $\alpha$  transcripcionalmente aumenta la expresión de muchas enzimas del metabolismo de ácidos grasos, incluyendo a la enzima deshidrogenasa de acetil coenzima A de ácidos grasos de cadena larga y media, por lo tanto regulando a la alta de manera crónica la capacidad de utilización de ácidos grasos por el corazón [Luna *et al.*, 2011] generando con ello un aumento en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos que, sin embargo, no llega a compensar el aumento en su captación y un aumento en la actividad de la PDK que disminuye la acción de la PDH y la utilización de glucosa [Thierier, 2006].

En el corazón diabético, la Acetil-CoA es predominantemente generada a partir de ácidos grasos. Además, las elevadas concentraciones de cuerpos cetónicos en el plasma de los pacientes diabéticos llevan a un aumento de la oxidación cardíaca del acetoacetato y del  $\beta$ -hidroxibutirato que contribuye a la reserva de Acetil-CoA que proviene de sustratos que no son carbohidratos. En general, se puede decir que el perfil sistémico alterado de lípidos, el gradiente, transporte y utilización de ácidos grasos por el corazón lleva a una disminución en la utilización de carbohidratos por parte del tejido miocárdico [Luna *et al.*, 2011]. Todo esto lleva a acumulación de lípidos intracelulares, lipotoxicidad, aumento de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, disminución de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, disfunción contráctil [Thierier, 2006].

### 3.3.7.2 Metabolismo de glucosa en el corazón diabético

El grado de respuesta a la insulina en los corazones diabéticos tipo 2 es variable dependiendo del grado de severidad de la diabetes. Puede afirmarse que la insulina induce mayormente la utilización de carbohidratos, aunque en estados avanzados de la enfermedad este efecto es menor. En modelos animales de DM

tipo 2, se han identificado cambios en la utilización de la glucosa en diversos tejidos. En la mitocondria la actividad de la PDH es suprimida, lo que disminuye la conversión del piruvato a AcetilCoA disminuyendo el flujo glucolítico. Debido a las alteraciones transcripcionales, alostéricas y covalentes de los complejos enzimáticos que se presentan en la DM, la generación aumentada de Acetil-CoA derivada de ácidos grasos y de NADH se activa a la PDK4, la cual fosforila y por lo tanto, inactiva a la PDH, inhibiéndose la utilización de piruvato proveniente de la glucólisis. Además, la PDK4 es transcripcionalmente regulada al alza, como consecuencia de la activación de los PPAR $\alpha$  [Buchanan *et al.*, 2005]. Estos cambios disminuyen la actividad de la PDH cardiaca. El deterioro de la captación de glucosa también es importante en la disminución de la utilización total de este combustible por el corazón diabético. En ratas diabéticas tipo 2, las tasas de captación de glucosa estimuladas por insulina se encuentran disminuidas, y están asociadas con el contenido de GLUT1 y GLUT4. En modelos animales con diabetes inducida tanto genéticamente como por la dieta se encuentra que la fosforilación de tirosina del receptor de insulina (IRS-1) cardíaco, está disminuida, resultando en una disminución del reclutamiento de GLUT4 a la membrana plasmática del cardiomiocito. Con menor número de GLUT4 se genera una marcada disminución de la entrada de glucosa al corazón [Desrois *et al.*, 2004]. En humanos, la acumulación de lípidos intracelulares en las células del músculo esquelético correlaciona con una menor utilización de glucosa estimulada por insulina, esta asociación es aún más fuerte que otros factores predisponentes para DM tipo 2, como el índice de masa corporal o el contenido total de grasa corporal, y aún más que aumentos previos de las concentraciones de glucosa sanguínea [McGarry, 2002].

En resumen, el corazón diabético es metabólicamente anormal presentando aumento de la oxidación de ácidos grasos y cuerpos cetónicos, además de una marcada disminución de la utilización de glucosa. Adicionalmente, existen reportes de función mitocondrial alterada que lleva a una disminución en la oferta energética para la célula. En la medida en que se conozcan a nivel molecular estos cambios, se estará en posición de diseñar fármacos más selectivos que permitan limitar/revertir las alteraciones [Luna *et al.*, 2011].

### 3.3.8 Memoria metabólica

Recientemente, ha tomado fuerza el concepto de memoria metabólica en el curso de la DM como uno de los factores que favorecen la susceptibilidad del paciente diabético para desarrollar ECV. Este concepto propone que la hiperglucemia de larga duración, por un manejo deficiente de la glucemia en los pacientes diabéticos, induce alteraciones permanentes en varios tejidos particularmente a nivel vascular, aún después de que la hiperglucemia se haya normalizado. Por el contrario, está implícito que un buen control de la glucosa

sanguínea sobre todo en etapas tempranas, trae consigo beneficios duraderos. Se sabe en la actualidad que incluso unos cuantos años de buen control glucémico del paciente con DM pueden traer beneficios duraderos en la salud [Luna *et al.*, 2011]. El estudio DCCT (Diabetes Control and Complications Trial, 1993) fue uno de los estudios pioneros sobre el concepto de memoria metabólica, realizado con pacientes con DM tipo I, en el que un grupo de pacientes fue tratado con terapia convencional y el otro con terapia intensiva con insulina (TII). El estudio mostró contundentemente que en estos pacientes la TII retarda el inicio (prevención primaria) y enlentece la progresión (prevención secundaria) de la retinopatía asociada a la DM, además de disminuir otras complicaciones asociadas a la microvasculatura como la nefropatía y la neuropatía. Un estudio subsecuente, llamado EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications), demostró que el grado de control metabólico fue fundamental para prevenir la enfermedad coronaria, mostrando claramente que al mantener un buen control metabólico, se puede reducir el riesgo de sufrir ECV en los pacientes con DM tipo 1 hasta en un 57% [Nathan *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2011].

A pesar de que los hallazgos de los estudios DCCT y EDIC se refieren a pacientes con diabetes tipo 1, es muy posible que también ocurra lo mismo con los pacientes con diabetes tipo 2 [Luna *et al.*, 2011]. Por lo anterior, cobra real trascendencia el hallazgo de sustancias capaces de disminuir los niveles de glucosa en los pacientes diabéticos.

### 3.4 MITOCONDRIA

Las mitocondrias juegan un papel crítico en la generación de la energía metabólica en las células eucariotas. Son responsables de la generación de la energía útil derivada del metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos, que son convertidos en ATP por el proceso de fosforilación oxidativa. La mayoría de las proteínas mitocondriales se traducen en los ribosomas citosólicos libres y son trasladadas dentro del orgánulo mediante señales específicas. Además, las mitocondrias son los únicos orgánulos citoplásmicos que contienen su propio ADN, que codifica ARNt, ARNr y algunas proteínas mitocondriales. El conjunto de las mitocondrias, por lo tanto, implica proteínas codificadas por su propio genoma y traducidas dentro del orgánulo, así como proteínas codificadas por el genoma nuclear e importadas desde el citosol [Cooper, 2000].

Este orgánulo desempeña diferentes funciones, en ella tienen lugar algunas vías metabólicas como la cetogénesis, cetolisis, entre otras; también interviene en la remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, en la termogénesis y control de la apoptosis, son las principales generadoras de especies reactivas de oxígeno en la célula y pueden

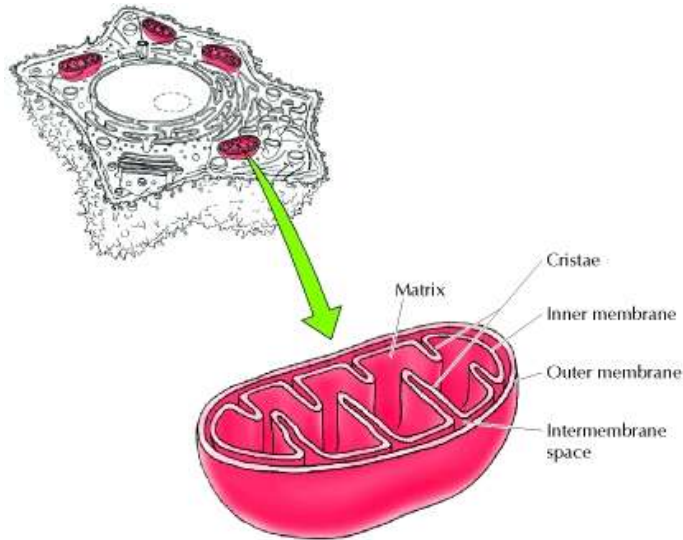


provocar la muerte celular por necrosis en condiciones de estrés oxidativo [Arredondo, 2012].

### 3.4.1 Organización y función de la mitocondria

Las mitocondrias son cilíndricas, aunque experimentan cambios de forma sutiles derivados de su actividad. Normalmente, se les representa en forma alargada. Su tamaño oscila entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 5  $\mu\text{m}$  de longitud. Su número depende del tejido celular y de las necesidades energéticas de la célula. Una célula puede tener desde unas pocas mitocondrias hasta miles de ellas. El mayor número se encuentra en las células nerviosas, musculares y el hígado; por ejemplo, en los hepatocitos suelen hallarse entre 1000 y 2000 mitocondrias. Se encuentran ubicadas en las regiones de las células donde la demanda de energía es mayor, por lo que se desplazan de un lado a otro del citoplasma hacia las zonas necesitadas de energía. Los microtúbulos y sus proteínas asociadas intervienen en tales desplazamientos. Al conjunto de las mitocondrias de la célula se le denomina condrioma celular [Arredondo *et al.*, 2012].

La mitocondria está rodeada por un sistema de doble membrana, que consiste en una membrana interna y una externa separadas por el espacio intermembranal (figura 6). La membrana interna forma numerosos pliegues (crestas) que se extienden en el interior del orgánulo (matriz mitocondrial). La matriz y la membrana interna representan los compartimentos de mayor trabajo de la mitocondria [Cooper, 2000]. Las membranas interna y externa poseen características morfológicas, funcionales y de permeabilidad muy diferentes [Arredondo *et al.*, 2012].

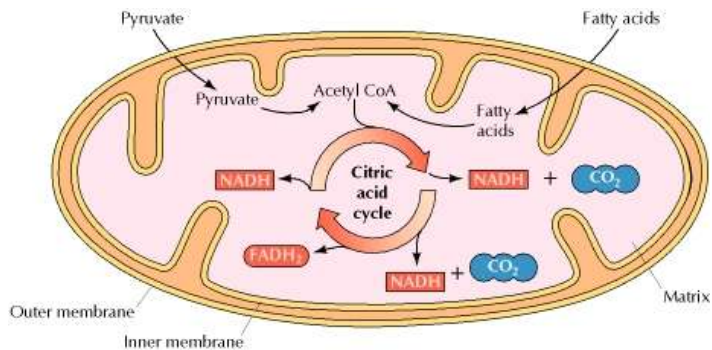


**Figura 6.** Estructura de la mitocondria

Las mitocondrias están rodeadas por un sistema de doble membrana, consistente en una membrana interna y una externa. Los pliegues de la membrana interna (crestas) se extienden dentro de la matriz. Tomada y modificada de *La célula: un enfoque molecular*, 2<sup>nd</sup> ed. Cooper GM, Sunderland (MA): Sinauer Asociados; 2000.

La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones (crestas) con multitud de complejos enzimáticos y proteínas que regulan el paso de metabolitos. Esta resulta especialmente impermeable a iones, debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina y a la gran cantidad de bombas y transportadores específicos, como el translocador de nucleótidos de adenina. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas y, en condiciones fisiológicas, su permeabilidad es menos selectiva, gracias a la presencia de una proteína denominada porina o canal aniónico dependiente de voltaje, que permite el paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 Da [Arredondo et al., 2012]. La composición del espacio intermembranal es similar a la del citosol en lo que respecta a iones y moléculas pequeñas [Cooper, 2000].

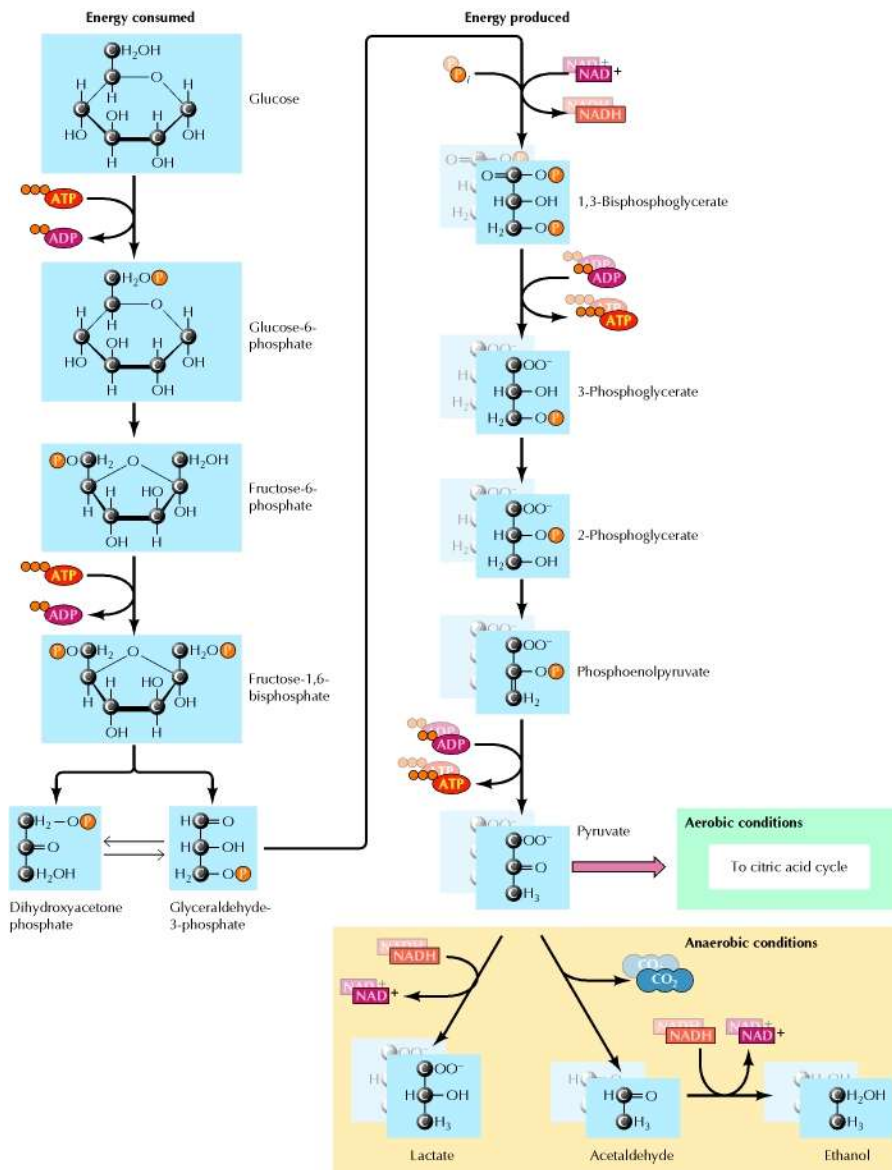
La matriz mitocondrial contiene su sistema genético, así como las enzimas responsables de las reacciones centrales de metabolismo oxidativo (figura 7) [Cooper, 2000].



**Figura 7.** Metabolismo en la matriz mitocondrial

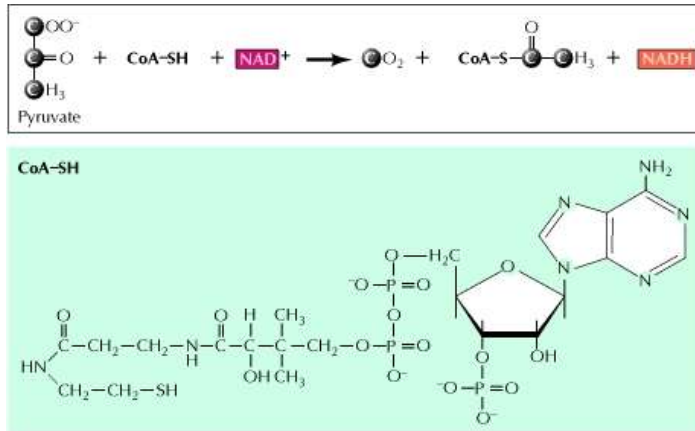
El piruvato y los ácidos grasos son importados desde el citosol y convertidos a acetil CoA en la matriz mitocondrial. El Acetil CoA es entonces oxidado hasta CO<sub>2</sub> vía el ciclo de ácido cítrico, la vía central del metabolismo oxidativo. Tomada y modificada de *La célula: un enfoque molecular*, 2<sup>da</sup> ed. Cooper GM, Sunderland (MA): Sinauer Asociados; 2000.

El metabolismo oxidativo de la glucosa y los ácidos grasos representa la principal fuente de energía metabólica en células animales. Las fases iniciales de la glucólisis ocurren en el citosol, donde la glucosa es convertida a piruvato (figura 8), como se mencionó anteriormente. Esto implica la oxidación inicial del piruvato a Acetil-CoA, que entra en el ciclo de ácido cítrico o ciclo de Krebs (figuras 9 y 10). La oxidación de los ácidos grasos también produce Acetil-CoA (figura 11). Las enzimas del ciclo de Krebs (localizadas en la matriz mitocondrial) tienen un papel fundamental en la degradación oxidativa tanto de carbohidratos como de ácidos grasos [Cooper, 2000].



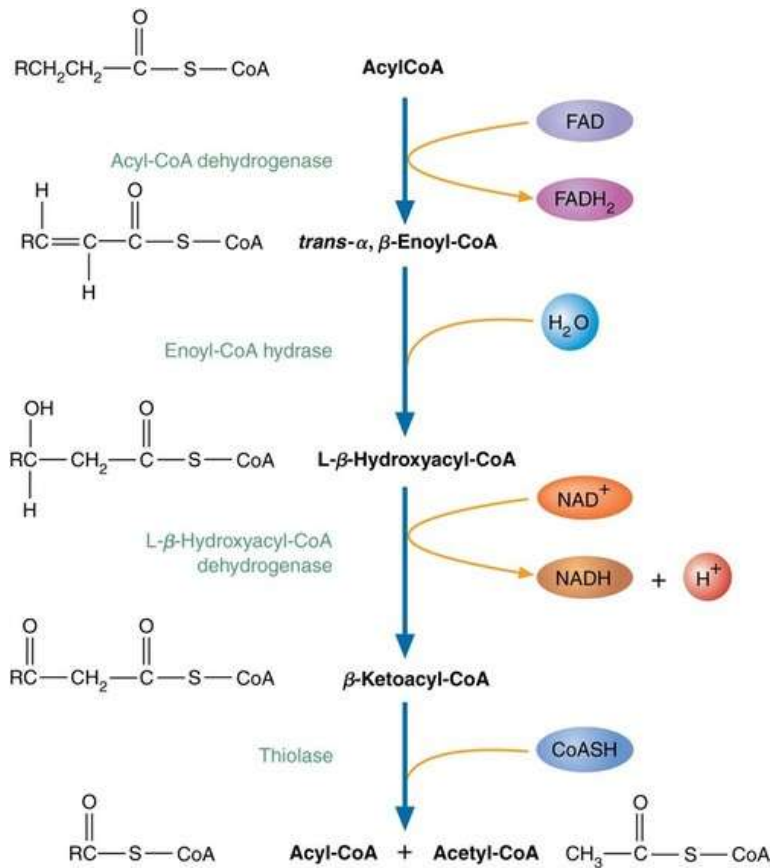
**Figura 8.** Reacciones de la glucólisis

La glucosa es metabolizada a piruvato, junto con la formación de dos moléculas de ATP y NADH. Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es metabolizado vía el ciclo del ácido cítrico. Tomada y modificada de *La célula: un enfoque molecular*, 2<sup>nd</sup> ed. Cooper GM, Sunderland (MA): Sinauer Asociados; 2000.



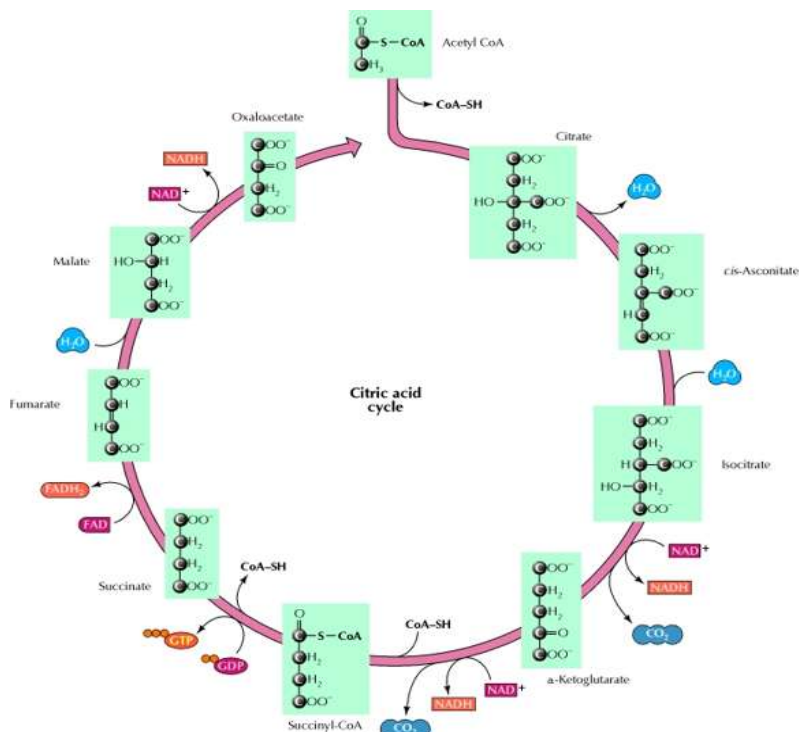
**Figura 10.** Descarboxilación oxidativa del piruvato.

El piruvato es convertido a  $\text{CO}_2$  y acetil-CoA, produciendo una molécula de NADH en el proceso. La Coenzima A (CoA-SH) es portadora general de grupos acilo activados en diversas reacciones. Tomada y modificada de *La célula: un enfoque molecular*, 2<sup>na</sup> ed. Cooper GM, Sunderland (MA): Sinauer Asociados; 2000.



**Figura 9.** Oxidación de los ácidos grasos

El ácido graso es inicialmente unido a la coenzima A con el gasto de una molécula de ATP. La oxidación del ácido graso continúa con la eliminación por etapas de unidades de dos carbonos como acetil-CoA, junto con la formación de una molécula de NADH y una de  $\text{FADH}_2$ . Obtenida de <http://scienceknowledge.tumblr.com/post/70794594308>.



**Figura 11.** Ciclo del ácido cítrico.

Un grupo acetilo de dos carbonos es transferido desde el acetil-CoA a oxaloacetato, formando citrato. Entonces, dos carbonos del citrato son oxidados a  $\text{CO}_2$  y el oxaloacetato es regenerado. Cada vuelta del ciclo genera una molécula de GTP, tres de NADH y una de  $\text{FADH}_2$ . Tomada y modificada de *La célula: un enfoque molecular*, 2<sup>da</sup> ed. Cooper GM, Sunderland (MA): Sinauer Asociados; 2000.

La energía derivada de estas reacciones de transferencia de electrones, mediante la fosforilación oxidativa, se convierte en energía potencial almacenada en un gradiente de protones a través de la membrana, que se utiliza para la síntesis de ATP. Así, la membrana interna mitocondrial representa el principal sitio de generación de ATP, y este rol crítico está reflejado en su estructura. En consecuencia, la membrana interna mitocondrial es la barrera funcional para el pasaje de moléculas pequeñas entre en citosol y la matriz y mantiene el gradiente de protones que impulsa la fosforilación oxidativa [Cooper, 2000].

### 3.4.2 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

Casi toda la energía que se libera durante la oxidación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, queda disponible dentro de las mitocondrias como equivalentes reductores ( $-\text{H}$  o electrones). Las enzimas del ácido cítrico y de la  $\beta$ -oxidación están contenidas en mitocondrias, junto con la cadena respiratoria, que reúne y transporta equivalentes reductores y los dirige hacia su reacción final con oxígeno para formar agua, y la maquinaria para la fosforilación oxidativa, el proceso

mediante el cual la energía libre liberada se atrapa como fosfato de alta energía [Harper, 2009].

Los electrones fluyen por la cadena respiratoria desde  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  hacia  $\text{O}_2/2\text{H}_2\text{O}$ , y pasan por tres complejos proteínicos grandes: **NADH- Q oxidorreductasa (complejo I)**, donde se transfieren electrones desde NADH hacia la coenzima Q (Q) (también llamada **ubiquinona**); **Q-citocromo c oxidorreductasa (complejo III)**, que pasa los electrones hacia el citocromo c, y **citocromo c oxidasa (complejo IV)**, que completa la cadena, pasa los electrones hacia  $\text{O}_2$  y hace que se reduzca a  $\text{H}_2\text{O}$ . Algunas sustancias con potenciales redox más positivos que  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  (por ejemplo: succinato) pasan electrones hacia Q por medio de un cuarto complejo, la **succinato-Q reductasa (complejo II)**, en lugar del complejo I. Los cuatro complejos están embebidos en la membrana mitocondrial interna, pero Q y citocromo c son móviles. Q se difunde con rapidez dentro de la membrana, mientras que el citocromo c es una proteína soluble. El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV da por resultado el bombeo de protones desde la matriz a través de la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembranal [Harper, 2009].

**a. Complejo I (NADH-Q Oxidorreductasa ó NADH deshidrogenasa).** Es una proteína grande con forma de L, de múltiples subunidades, entre las que se encuentra una flavoproteína que contiene FMN (flavina mononucleótido oxidado) y como mínimo seis centros ferro-sulfurados (Fe-S, participan en reacciones de transferencia de un solo electrón en las cuales un átomo de Fe pasa por oxidorreducción entre  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ). Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde NADH hacia Q, junto con la transferencia de cuatro  $\text{H}^+$  a través de la membrana:

En un inicio, los electrones se transfieren desde NADH hacia FMN, después hacia una serie de centros Fe-S, y por último hacia Q. Por lo tanto, el complejo I es una bomba de protones impulsada por la energía de la transferencia electrónica, y la reacción que cataliza es vectorial: mueve los protones en una dirección específica



desde una localización (la matriz, que se carga negativamente con la salida de los protones) hacia otra (el espacio intermembrana, que se carga positivamente).

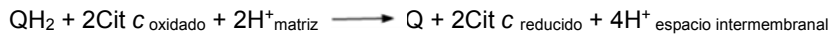
El amital, la rotenona y el antibiótico piericidina A inhiben el flujo electrónico desde los centros Fe-S del complejo I a la ubiquinona, con el consecuente bloqueo global del proceso de fosforilación oxidativa.

El ubiquinol (QH<sub>2</sub>) difunde por la membrana mitocondrial interna desde el complejo I al complejo III, donde se oxida a Q en un proceso acompañado de la salida de H<sup>+</sup> hacia el exterior [Harper, 2009 & Lehninger, 2009].

**b. Complejo II (Succinato-Q reductasa ó succinato deshidrogenasa).** Es la única enzima del ciclo del ácido cítrico ligada a la membrana. En este complejo se forma FADH<sub>2</sub> durante la conversión de succinato en fumarato en el ciclo del ácido cítrico. A continuación, los electrones se pasan por medio de varios centros Fe-S hacia Q. El glicerol-3-fosfato (generado en la desintegración de triacilglicerol o a partir de la glucólisis) y la acil-CoA también pasan electrones hacia Q mediante vías diferentes en que participan flavoproteínas [Harper, 2009 & Lehninger, 2009].

**c. Complejo III (Q-citocromo c oxidoreductasa ó complejo citocromo bc<sub>1</sub>).** Este complejo acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH<sub>2</sub>) al citocromo c con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembranal.

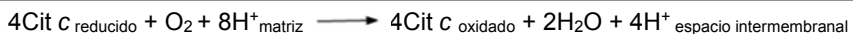
Se cree que el proceso incluye citocromos c<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, y b<sub>h</sub>, y un Fe-S Rieske (un Fe-S poco común en el cual uno de los átomos de Fe está enlazado a dos grupos de histidina-SH más que a dos grupos de cisteína-SH) y se conoce como el ciclo Q. El ciclo Q adapta el cambio entre el transportador de dos electrones, la ubiquinona, y los transportadores de un electrón, los citocromos. Aunque la vía de los electrones por este segmento de la cadena respiratoria es complicada, el efecto neto de la



transferencia es simple: QH<sub>2</sub> se oxida a Q, al tiempo que se reducen dos moléculas de citocromo c [Harper, 2009 & Lehninger, 2009].

**d. Complejo IV (citocromo c oxidasa).** En el último paso de la cadena respiratoria, este complejo transporta electrones desde el citocromo c al oxígeno molecular, reduciéndolo a H<sub>2</sub>O.

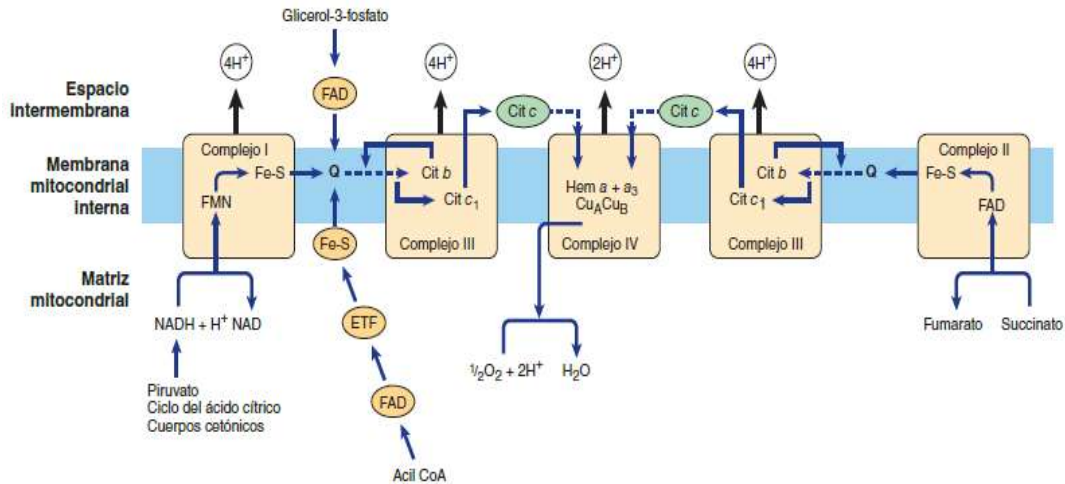
Por cada cuatro electrones que pasan a través del complejo, el enzima consume cuatro H<sup>+</sup> “sustrato” de la matriz, convirtiendo el O<sub>2</sub> en 2H<sub>2</sub>O. También utiliza la energía de esta reacción redox para bombear un protón hacia el espacio intermembranal por cada electrón que pasa, añadiéndose al potencial electroquímico producido por el transporte del protón impulsado por el potencial redox a través de los complejos I y III. En esta reducción del O<sub>2</sub> por cuatro electrones



intervienen centros redox que transportan un único electrón al mismo tiempo, y se ha de dar sin la liberación de los intermedios incompletamente reducidos tales como



el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilo libres, especies muy reactivas que dañarían los componentes celulares. Los intermediarios se mantienen fuertemente unidos al complejo hasta que se convierten completamente en agua [Harper, 2009 & Lehninger, 2009].

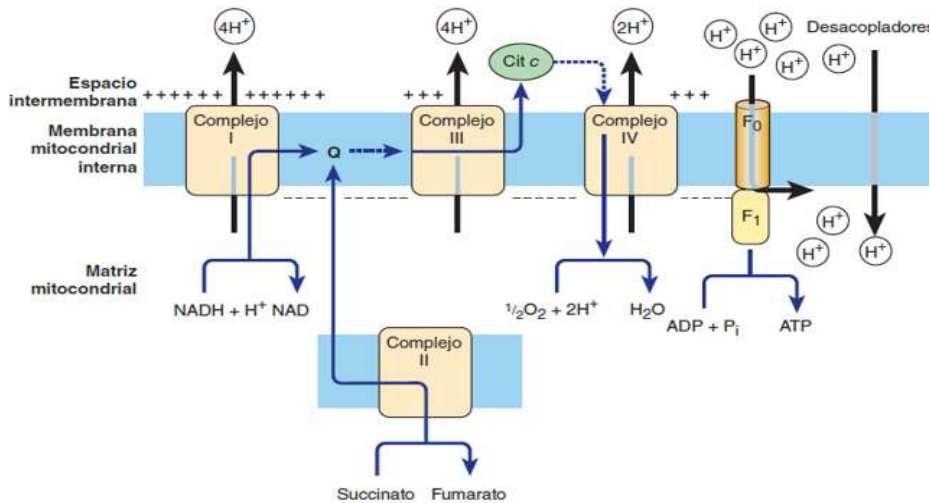


**Figura 12.** Flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria.

La imagen muestra los puntos de entrada de equivalentes reductores desde sustratos importantes. Q y cit son componentes móviles del sistema según se indica por las flechas punteadas. (Fe-S, proteína hierro. Azufre; ETF, flavoproteína transferidora de electrón; Q, coenzima Q o ubiquinona; cit, citocromo). Obtenida de *Bioquímica ilustrada*, 28 edición. Harper, Mc Graw Hill. China, 2009

El flujo de electrones por la cadena respiratoria genera ATP por medio del proceso de fosforilación oxidativa. La teoría quimiosmótica (Mitchell, 1961) postula que los dos procesos están acoplados mediante un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, de manera que la fuerza motriz de protón causada por la diferencia de potencial electroquímico (negativa en el lado de la matriz) impulsa el mecanismo de síntesis de ATP. Como se mencionó, los complejos I, III y IV actúan como bombas de protones. Dado que la membrana mitocondrial interna es impermeable a iones en general, y en especial a protones, éstos se acumulan en el espacio intermembrana, lo que crea la fuerza motriz de protón predicha por la teoría quimiosmótica. La fuerza motriz de los protones impulsa una ATP sintasa ubicada en la membrana que en presencia de P<sub>i</sub> + ADP forma ATP. La ATP sintasa está embebida en la membrana interna, junto con los complejos de la cadena respiratoria (figura 13). Varias subunidades de la proteína forman una estructura parecida a una bola alrededor de un eje conocido como F<sub>1</sub>, que se proyecta hacia la matriz y contiene el mecanismo de fosforilación. La

subunidad  $F_1$  está fija a un complejo de proteína de membrana conocida como subunidad  $F_0$ , que también consta de varias subunidades proteínicas.  $F_0$  abarca la membrana y forma un canal de protones. El flujo de estos últimos a través de  $F_0$  hace que rote, lo que impulsa la producción de ATP en el complejo  $F_1$ . Se cree que esto ocurre por medio de un mecanismo de cambio de unión en el cual, a medida que el eje rota, la conformación de las subunidades  $\beta$  en  $F_1$  cambia desde una que se une con firmeza al ATP hacia otra que libera ATP y se une a ADP y  $P_i$  de modo que puede formarse el siguiente ATP. Se estima que por cada NADH oxidado, los complejos I y III translocan cuatro protones cada uno, y el complejo IV transloca dos



**Figura 13.** Teoría quimiosmótica de la fosforilación oxidativa.

Los complejos I, III y IV actúan como bombas de protón, lo que crea un gradiente de protón a través de la membrana, que es negativa en el lado de la matriz. La fuerza motriz de protón generada impulsa la síntesis de ATP conforme los protones fluyen de regreso hacia la matriz por medio de la ATP sintasa. Los desacopladores aumentan la permeabilidad de la membrana a iones, lo que colapsa el gradiente de protón al permitir que el  $H^+$  pase sin atravesar la ATP sintasa, y, así, desacopla el flujo de electrón a través de los complejos respiratorios, de la síntesis de ATP (Q, coenzima Q o ubiquinona; cit, citocromo). Obtenida de *Bioquímica ilustrada*, 28 edición. Harper, Mc Graw Hill. China, 2009

Por cada mol de sustrato oxidado mediante los complejos I, III y IV en la cadena respiratoria (es decir, por medio de NADH), se forman 2.5 mol de ATP por cada 0.5 mol de  $O_2$  consumido. Por otra parte, cuando un mol de sustrato (por ejemplo succinato o 3-fosfoglicerato) se oxida por medio de los complejos II, III y IV, sólo se forman 1.5 mol de ATP. Estas reacciones se conocen como fosforilación oxidativa en el ámbito de la cadena respiratoria. Al tomar en cuenta estos valores, se estima que cerca de 90% de los fosfatos de alta energía producidos a partir de

la oxidación completa de 1 mol de glucosa se obtiene mediante fosforilación oxidativa acoplada a la cadena respiratoria [Harper, 2009].

### 3.4.3 Producción de especies reactivas de oxígeno

Diversos pasos en la ruta de reducción del oxígeno en la mitocondria tienen el potencial para producir radicales libres muy reactivos que pueden dañar las células [Lehninger, 2009].

Se cree que la mitocondria es la principal fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno, con sitios específicos en los complejos en la cadena respiratoria mitocondrial que constituyen el principal origen de éstas. Los complejos con mayor aporte a la producción del ROS son el complejo I, el complejo III y el flujo inverso de electrones del complejo II [Apostolova & Victor, 2015].

## 3.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

Existe una amplia evidencia de estudios experimentales que sugieren que el estrés oxidativo y los radicales libres juegan un papel importante en la patogénesis y fisiopatología de las enfermedades cardíacas asociadas a la diabetes. El incremento en la generación de ROS y de nitrógeno (RNS) asociadas con la cardiomiopatía diabética, está acoplado con la reducción de las defensas antioxidantes y la modulación de las vías de señalización de proteínas [Towner *et al.*, 2015].

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar la estabilidad electroquímica.

Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a biomoléculas, membranas celulares y tejidos [Avello & Suwalski, 2006].

Los compuestos químicos y las reacciones capaces de generar especies de oxígeno tóxicas potenciales pueden denominarse prooxidantes. Por otro lado, los compuestos y las reacciones que eliminan, al recolectarlas, suprimir su acción u oponerse a sus acciones, son antioxidantes, e incluyen compuestos como NADH, glutatión reducido (GSH), ácido ascórbico y vitamina E. En una célula normal, hay un equilibrio apropiado entre prooxidantes y antioxidantes. Sin embargo, este equilibrio puede desviarse hacia los prooxidantes cuando la producción de especies de oxígeno aumenta mucho o las concentraciones de antioxidantes están

disminuidas. Este estado se llama estrés oxidativo y puede suscitar serio daño celular si el estrés es masivo o prolongado [Harper, 2009].

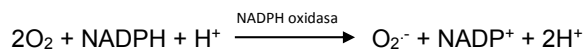
### 3.5.1 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es una molécula altamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo, es el principal responsable de la producción de ROS [Avello & Suwalski, 2006]. Las ROS que se producen con mayor frecuencia son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ) o peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ); sin embargo, hay especies químicas que estando igualmente implicadas en el estrés oxidativo, no presentan estructura química de radical como es el caso del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) o el ozono ( $O_3$ ) [López, 2007]. Algunas de las reacciones mediante las que se producen las ROS son:

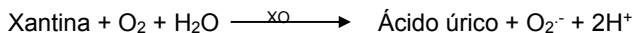
- Reacción de Fenton:  $Fe^{3+} + O_2^- \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$
- Reacción de Haber- Weiss:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + 2OH^{\cdot}$
- Reacción de dismutación por Superóxido dismutasa (SOD):  $2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$
- Reacción de dismutación por Catalasa:  $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

#### 3.5.1.1 Anión superóxido

La formación del radical superóxido ocurre por la reducción univalente del oxígeno, es decir, cuando el oxígeno acepta un electrón. Esta especie es relativamente inestable y se encuentra en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroperoxilo. El anión superóxido tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito en el consumo de oxígeno) de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en los eventos inmunológicos. Cuando estas células se activan, el complejo enzimático de la NADPH oxidasa reduce parcialmente el oxígeno de la siguiente forma:



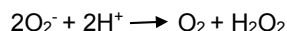
De la misma forma, la xantina oxidasa (XO) es capaz de reducir la molécula de oxígeno para dar el anión radical superóxido [Cárdenas & Pedraza, 2006].



#### 3.5.1.2 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Aunque no es un radical libre, tiene una gran lipoficidad que le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con el anión superóxido en

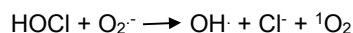
presencia de metales de transición, para generar el radical hidroxilo, por lo que se le considera un oxidante importante [Cárdenas & Pedraza, 2006].



### 3.5.1.3 Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su alta reactividad y su vida media corta, y suele actuar en los sitios cercanos a donde se produce. La formación del radical puede lograrse por la reacción de Haber-Weiss, antes mencionada.

Ahora bien, también se puede formar a partir del ácido hipocloroso [Cárdenas & Pedraza, 2006].



### 3.5.2 Especies reactivas de nitrógeno

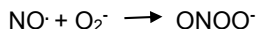
El óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), uno de los factores relajantes del músculo liso vascular, es un monóxido de nitrógeno y radical libre, producido a partir del aminoácido L-arginina por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS). Adicionalmente al efecto relajante, el óxido nítrico tiene otros efectos diversos, tanto fisiológicos como patológicos, los cuales dependerán de la reacción en la que participe, de las moléculas con las que reaccione y del tipo celular en donde actúe. Los efectos biológicos del  $\text{NO}\cdot$  pueden clasificarse en dos tipos: los efectos directos que son producidos por la reacción del  $\text{NO}\cdot$  directamente con ciertas moléculas blanco, y los efectos indirectos, los cuales se producen por la interacción de compuestos reactivos derivados del  $\text{NO}\cdot$  con otras moléculas. [Guzmán *et al.*, 2006].

El  $\text{NO}\cdot$  producido por las células endoteliales es un factor vasodilatador clave. Regula el tono vascular y la homeostasis redox, manteniendo las células del músculo liso vascular en estado quiescente no proliferativo y previene el reclutamiento de células inmunológicas en la pared arterial. La reducción de la biodisponibilidad del  $\text{NO}$ , que resulta en un mayor estrés oxidativo, es un sello distintivo de la disfunción endotelial y un importante contribuyente en la patogénesis de la aterosclerosis [Kohlgrüber *et al.*, 2016].

Las especies reactivas de los óxidos de nitrógeno comprenden, además del óxido nítrico, al dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2\cdot$ ), trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), tetróxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) y al peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ) [Guzmán *et al.*, 2006].

### 3.5.2.1 Anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>)

Este anión puede formarse por la combinación del radical óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) y el O<sub>2</sub><sup>-•</sup>:



El ONOO<sup>-</sup> es un potente oxidante que induce nitración del aminoácido tirosina en las proteínas, lipoperoxidación y citotoxicidad. Se ha encontrado involucrado en varios estados patológicos. Un exceso en la producción de O<sub>2</sub><sup>-•</sup> puede contrarrestar los efectos vasodilatadores del NO<sup>•</sup> induciendo vasoconstricción [Cárdenas & Pedraza, 2006].

### 3.5.3 Efectos de las ROS y RNS sobre las macromoléculas biológicas

La producción de ROS y RNS está controlada por los mecanismos antioxidantes de defensa. Sin embargo, este equilibrio se pierde cuando hay una excesiva producción de ROS y/o RNS o una deficiencia de los mecanismos antioxidantes, lo que conlleva a daños a las moléculas. Muchas moléculas deben ser reparadas (tal como el ADN) o incluso reemplazadas (como muchos tipos de proteínas oxidadas) [Cárdenas & Pedraza, 2006].

#### 3.5.3.1 Efecto sobre los ácidos nucleicos

Las ROS dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN) al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y aún enfermedades hereditarias. Se han detectado más de 20 tipos de modificaciones estructurales de las bases, observando que en presencia de las ROS se fragmenta el ADN y aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura de ADN entre los nucleosomas, ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina y con ello, alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción génica.

Existen mecanismos de reparación del ADN que se activan en el momento en que éste sufre modificaciones oxidativas. Cuando las ROS alcanzan el núcleo o se generan dentro de éste por la reacción de Fenton, estos mecanismos de reparación funcionan de manera eficiente, ya que continuamente se revisa que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN y en caso de existir alguna mutación, se repara el daño causado. Se ha reportado que el mecanismo de

reparación por escisión de bases, es el más importante en el caso de la modificación oxidativa. Cuando la modificación afecta regiones más extensas de ADN, actúa el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser reemplazado por la ADN polimerasa I y la ligasa [Cárdenas & Pedraza, 2006].

### **3.5.3.2 Efecto sobre las proteínas**

Uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo es el daño causado a las proteínas, debido a que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas. A diferencia de los ácidos nucleicos, los sistemas de reparación de las proteínas sólo se limitan a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas.

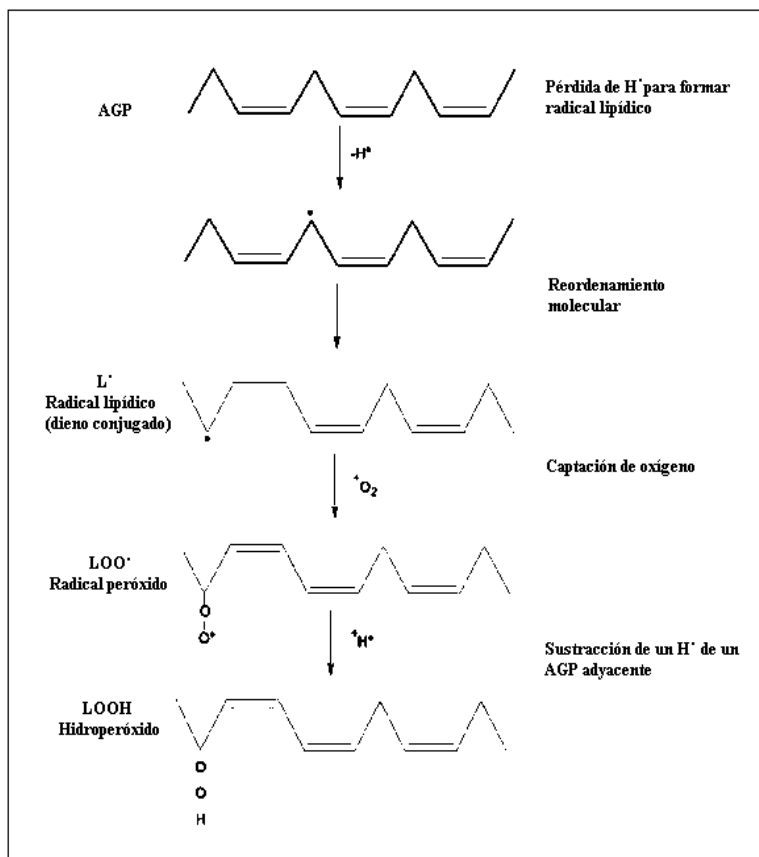
Los efectos de las ROS sobre las proteínas son: la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. Se ha vinculado una amplia diversidad de enfermedades con la presencia de proteínas oxidadas, algunas de éstas son: la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide y la catarogénesis [Cárdenas & Pedraza, 2006].

### **3.5.3.3 Efecto sobre los lípidos**

El efecto principal de las ROS sobre los lípidos es la lipoperoxidación, que se produce al contacto con los lípidos de las membranas con un agente oxidante, como cualquiera de las ROS [Cárdenas & Pedraza, 2006]. Este proceso afecta las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular [Venereo, 2002].

La lipoperoxidación es particularmente destructiva, ya que se desarrolla como una reacción de cadena autopropagante. Se inicia cuando las ROS atacan un ácido graso poliinsaturado (AGP) y le arrebatan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical libre acil-ácido graso. Rápidamente, esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en una radical libre peróxido ácido, que actúa como transportador de la reacción en cadena, ya que ataca a otros AGP e inicia nuevas reacciones. Este mecanismo se facilita con la presencia de iones de metales de transición y por los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP. Los productos finales de la lipoperoxidación son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxinonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). Las consecuencias del daño en la estructura molecular del AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas

celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica [Chihuaillaf et al., 2002].



**Figura 14.** Esquema de la lipoperoxidación.

Se muestra la reacción en cadena de la lipoperoxidación, en la cual un radical libre, principalmente el OH<sup>•</sup> capta un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un ácido graso poliinsaturado formando un radical lipídico (L<sup>•</sup>), el cual en contacto con el oxígeno, se transforma en un peróxido lipídico (LOO<sup>•</sup>) que es capaz de extraer un átomo de hidrógeno de una cadena insaturada adyacente y transformarse en un hidroperóxido (LOOH). La cadena finaliza con la interacción de un LOO<sup>•</sup> con otro radical o con un antioxidante y el LOOH puede fragmentarse produciendo compuestos como el MDA. Tomado y modificado de Labudda, 2013.



#### 3.5.4 Sistemas de defensa antioxidante

Dado que las ROS y otras formas de radicales libre se producen constantemente en forma inevitable durante los procesos metabólicos, la célula ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes, que reciben el nombre genérico de antioxidantes (AO), y pueden definirse como moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libre o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas [Chihuaílaf *et al.*, 2002].

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustratos oxidables se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar y/o interactuar más rápidamente con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno, que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente. La acción del antioxidante es de perder su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o más importantes. Los AO actúan como eliminadores (neutralizadores, scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los AO exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen [Venereo, 2002].

Los antioxidantes pueden clasificarse de la siguiente manera [Halliwell & Gutteridge, 1999].

- Agentes que catalíticamente remueven los radicales libres y a otras especies reactivas. Ejemplos: enzimas SOD, catalasa, peroxidasas y antioxidantes específicos para el grupo tiol.
- Proteínas que abaten la disponibilidad de los prooxidantes tal como los iones de hierro o cobre, y el grupo hemo. Ejemplos: ferritina, transferrina, hapoglobinas, hemopexina y metalotioneína.
- Proteínas que protegen biomoléculas contra el daño (incluyendo estrés oxidativo) por otros mecanismos. Ejemplo: proteínas de choque térmico localizadas en el retículo endoplásmico, periplasma y citoplasma. Tienen como función la estabilización y cobertura de la estructura proteica parcialmente plegada.
- Agentes de bajo peso molecular que atrapan ROS y RNS. Ejemplos: glutatión, tocoferol, bilirrubina y ácido úrico. Algunos agentes AO de bajo peso molecular que provienen de la dieta, especialmente la vitamina C y

el tocoferol, están íntimamente relacionados con la nutrición y la defensa antioxidante.

#### **3.5.4.1 Antioxidantes no enzimáticos**

Los AO no enzimáticos constituyen un heterogéneo grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. En esencia, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y núcleo y en fluidos extracelulares. Un ejemplo de ellos es la vitamina C [Chihuaílaf *et al.*, 2002].

##### **3.5.4.1.1 Glutatión**

Su forma reducida (GSH) es un tripéptido ( $\gamma$ -glutamyl-cistein-glicina) es el principal compuesto tiólico antioxidante y buffer redox de la célula, que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante (10-12 mM) en las células de mamíferos, encontrándose en el núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico y citosol. Junto con su forma oxidada (GSSG) mantiene el equilibrio redox, función que es crucial para el delicado mantenimiento del ambiente redox celular entre situaciones de estrés oxidativo. El GSH participa en el mantenimiento adecuado del estado de óxido-reducción de las proteínas nucleares a través de la presencia de proteínas con grupos sulfhidrilo, que son vitales para la expresión y reparación del DNA. El efecto protector del GSH contra el estrés oxidativo se debe a su papel como participante en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; es cofactor de varias enzimas de desintoxicación contra el estrés oxidativo, como la glutatión peroxidasa; es captador directo de oxígeno singlete y OH; es desintoxicante de  $H_2O_2$  y peróxidos lipídicos a través de la acción enzimática de la glutatión peroxidasa y es regenerador de antioxidantes como el tocoferol o ácido ascórbico a sus formas activas. Esta capacidad del GSH para la regeneración de antioxidantes está relacionado con el estado redox de la pareja GSH-disulfuro-GSH (GSSG/2GSH). Altos niveles de GSSG pueden inducir estrés oxidativo y daño de múltiples enzimas. De hecho, uno de los mejores métodos para evaluar el estrés oxidativo dentro de las células es la evaluación de la relación GSSG/GSH [Apostolova & Victor, 2015; Chihuaílaf *et al.*, 2002].

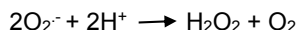
#### **3.5.4.2 Antioxidantes enzimáticos**

El grupo de AO enzimáticos cataliza la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías

metabólicas [Chihuaílaf *et al.*, 2002]. Las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRs) constituyen algunos de los antioxidantes enzimáticos de importancia [Cárdenas & Pedraza, 2006].

#### 3.5.4.2.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Su distribución es amplia en el organismo. Está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD: contienen cobre o zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio intermembrana mitocondrial; la Mn-SOD, contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial. Estas enzimas dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido [Venereo, 2002; Cárdenas & Pedraza, 2006].



### 3.6 PLANTAS MEDICINALES

Numerosos estudios en nutrición humana, demuestran una estrecha correlación entre el consumo de frutas y verduras y la menor incidencia de enfermedades crónico-degenerativas, debido a su bajo contenido en colesterol y a la presencia de vitaminas, fibra, antioxidantes naturales y minerales, entre otras características. En las frutas, legumbres y algunos vegetales se encuentran sustancias capaces de atrapar radicales libres, mejorando la defensa antioxidante, y se ha reportado que son capaces de detener o prevenir el desarrollo de tumores y los efectos bioquímicos asociados con la progresión de los mismos; este potencial se atribuye, principalmente, a sus propiedades antioxidantes [Castañeda *et al.*, 2008].

La utilización de plantas representa una opción en el manejo de enfermedades, más económica y de mayor accesibilidad a personas que carecen de acceso a moléculas químicas de patente, o en su caso a quienes desean reducir el efecto colateral a órganos no blanco por el uso frecuente de medicamentos químicos. Dentro de las políticas de la OMS está la necesidad de aprovechar la contribución potencial de la Medicina Tradicional Complementaria (MTC) a la salud, bienestar y la atención de la salud centrada en las personas y promover la utilización segura y eficaz de la MTC a través de la reglamentación y la investigación, así como mediante la incorporación de productos, profesionales y prácticas en los sistemas de salud, según proceda [Navarrete, 2016].

### 3.6.1 Plantas medicinales con actividad antioxidante

Existen plantas como la *Daucus carota* (zanahoria), la *Curcubita máxima* D (calabaza) y otros frutos coloreados, que contienen  $\beta$  carotenos, precursores de la vitamina A, que tienen una fuerte acción antioxidante. Los aceites de *Glycine max* L (soya), *Gossypium barbadense* L (algodón), *Zea mays* L (maíz) contienen vitamina E. La *Psidium guajaba* L (guayaba) tiene alto contenido de vitamina C, así como la naranja, toronja y otros cítricos.

La *Musa paradisiaca* L (plátano burro) contiene una mezcla compleja de polihidroxifenoles y taninos que inhiben la peroxidación lipídica en el modelo de homogenado de cerebro de ratas. Los bioflavonoides contenidos en el *Arachis hipogea* (cacahuete), duplican la resistencia de las paredes de los vasos sanguíneos en animales de experimentación, por la presencia de sustancias con acción antioxidante. La corteza del pino *Pino cubensis* G, contiene proantocianidinas oligoméricas, clase de flavonoide con una fuerte acción antioxidante. Las semillas de uva (*Vitis vinífera*) poseen un alto contenido de flavonoides, que disminuyen el riesgo de enfermedades como la aterosclerosis coronaria y esto es atribuido a sus propiedades antioxidantes. La uva negra contiene resveratrol para protegerse a sí misma de hongos; el resveratrol evita el daño producido por el colesterol en las arterias. En la actualidad es muy estudiado el extracto de corteza de mango (*Mangifera indica*) L por contener flavonoides, taninos y microelementos como el Fe, Se, Cu y Zn, que tienen acción sobre algunas neoplasias, polineuritis, psoriasis, etc. [García Bacallao *et al.*, 2001].

### 3.6.2 Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante

Existen numerosas especies vegetales con posible actividad hipoglucemiante. Algunas de ellas están siendo ampliamente estudiadas y, aunque es necesario realizar un mayor número de ensayos clínicos controlados, los resultados de los trabajos realizados en los últimos años son positivos, por la eficacia que se desprende de ellos y por la escasa toxicidad a las dosis recomendadas, por lo que podrían utilizarse por largos periodos.

Entre las numerosas especies vegetales con actividad hipoglucemiante, algunas son: la goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) que también tiene propiedades hipocolesterolemiantes, y la alholva (*Trigonella foenum-graecum* L.), de la cual se utilizan sus semillas. La momórdica (*Momordica charantia*) o melón amargo, procede de la India y de la que se utilizan sus frutos, principalmente; la Anemarrena (*Anemarrhena asphodeloides*) y la Gimnema (*Gymnema sylvestre*), ambas procedentes de la medicina tradicional China [López Luengo, 2006].

La medicina tradicional mexicana data de tiempos prehispánicos en la atención primaria de la salud. Algunos reportes refieren especies vegetales con

elevada diversidad de metabolitos secundarios, con efecto hipoglucemiante tanto en animales como en humanos. Actualmente, se estiman más de 300 especies vegetales con actividad hipoglucemiante, superando a otros agentes potenciales con esta propiedad, en los cuales, su efecto ha sido demostrado experimental y clínicamente en menor proporción [Villarreal et al., 2015].

Algunas de las especies vegetales utilizadas en México por sus propiedades hipoglucemiantes que han sido científicamente comprobadas, son, entre muchas otras [Villarreal et al., 2015]:

| Nombre científico              | Nombre común     |
|--------------------------------|------------------|
| <i>Catharanthus roseus</i>     | Vicaria          |
| <i>Thitonia diversifolia</i>   | Girasol mexicano |
| <i>Opuntia cochenillifera</i>  | Nopal            |
| <i>Cecropia obtusifolia</i>    | Guarumo          |
| <i>Sechium edule</i>           | Chayote          |
| <i>Momordica charantia</i>     | Cundeamor        |
| <i>Equisetum myriochaetum</i>  | Cola de caballo  |
| <i>Cnidioscolus chayamansa</i> | Chaya            |
| <i>Mammea americana</i>        | Mamey            |
| <i>Persea americana</i>        | Aguacate         |
| <i>Al.oe vera</i>              | Sábila           |

**Tabla 1.** Plantas con propiedades hipoglucemiantes

### 3.6.3 *Eryngium* L.

El género *Eryngium* L. pertenece a la subfamilia Saniculoideae Drude, de la familia Apiaceae Lindley, también conocida como Umbelliferae Juss. Agrupa entre 230 y 250 especies distribuidas en las regiones templadas y tropicales del planeta. Sus componentes se distribuyen desigualmente entre y dentro de los hemisferios oriental y occidental. Cerca de dos tercios de las especies de *Eryngium* crecen en el norte, centro y sur de América [García, 2013].

En el género se incluyen plantas herbáceas bianuales o perennes, caulescentes o acaulescentes, usualmente glabras y erectas. Tienen raíces fuertes o raicillas fibrosas. Las hojas son simples, lobadas o espinoso-dentadas a lineares, de venación variable, desde reticuladas hasta paralelinervias y con aspecto semejante al de algunas monocotiledóneas. Las flores se encuentran dispuestas en cabezuelas bracteadas; el cáliz generalmente está mejor desarrollado que la corola, los pétalos son de color blanco a púrpura y sésiles. El fruto es globoso u ovoide, cubierto con escamas o tubérculos. *Eryngium* es fácilmente distinguible de otros miembros de las Apiaceae por sus inflorescencias capitadas y por tener una sola bractéola por flor. Sin embargo, el género es morfológicamente muy variable.

Algunas plantas son postradas o de sólo unos pocos centímetros de alto, otras son erectas y de hasta 3 m de alto [Calviño *et al.*, 2008].

En medicina tradicional, varias especies del género son utilizadas para tratar diversos trastornos inflamatorios, edema, sinusitis, infecciones urinarias, etc., y mordidas de serpiente o escorpión. *Eryngium campestre* es conocida por sus propiedades antiedema, también utilizada en infecciones de tracto urinario y enfermedades renales; *Eryngium creticum* suele emplearse en heridas inflamadas; *E. yuccifolium*, *E. maritimum*, *E. bilardieri* y *E. foetidum* han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas [Küperi *et al.*, 2006].

#### 3.6.4 *Eryngium carlinae* F. Delaroche

*Eryngium carlinae* se conoce comúnmente en México como “hierba del sapo”, y es utilizada en medicina tradicional para diversos tipos de enfermedades. Es una hierba común que crece de manera silvestre y abundante en los campos mexicanos. Suele emplearse para el tratamiento de la disentería, para las aftas en recién nacidos, para tratar la diarrea y como antiséptico en varias enfermedades de la piel [Pérez, 2006].

*E. carlinae* crece en praderas, pastizales, hábitats perturbados del bosque de encino, pino-encino y de coníferas, entre los 1900-3500 m de altitud. Florece de mayo a julio y fructifica de agosto a enero. Se conoce su distribución en la Ciudad de México, Durango, Estado de México, Michoacán, Hidalgo y hasta el sur de México; Guatemala, Costa Rica y Sudamérica. En Michoacán, se registra a lo largo y de ambos lados de la Sierra del Centro y región de los Valles y Ciénagas [García, 2013]. Es una hierba perenne, glabra, acaule o cortamente caulescente; raíz delgada y axonomorfa; tallos generalmente ramificados desde la base, de 5 a 50 cm de largo, varios, postrados o ascendentes; hojas basales arrosetadas, oblanceoladas u oblongas, subcoriáceas, de 2 a 10 cm de largo y de 0.5 a 2 cm de ancho, la base largamente cuneada, ápice obtuso, los márgenes callosos, gruesamente espinuloso-serrados, frecuentemente incisos o lobados, nervaduras pinnado-reticuladas; pecíolos de 0.5 a 2 cm de largo, anchamente alados, mucho más cortos que la lámina; hojas caulinares escasas, generalmente opuestas, las superiores sésiles, incisas; inflorescencias trifurcadas o escasamente cimoso-divaricadas; cabezuelas pequeñas, generalmente numerosas, de color azul violeta, de 5 a 12 mm de largo y de 5 a 10 mm de ancho, anchamente ovoides a ovoide-cilíndricas, pedunculadas, flores numerosas [García, 2013] (figura 15).



**Figura 15.** Planta de *Eryngium carlinae* mostrando sus inflorescencias.

La decocción de las partes aéreas de la planta se utiliza para tratar la tos, indigestión, trastornos lipídicos y la diabetes, así como para regular la presión arterial. Su extracto etanólico ha demostrado poseer propiedades antioxidantes mediante la eliminación del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y los radicales ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], probablemente debido al contenido de flavonoides y fenoles encontrados en el extracto [Noriega *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2014]. En el extracto hexánico de *E. carlinae* se han identificado mayormente terpenos y sesquiterpenos (tabla 1), los cuales han sido ampliamente relacionados con el poder antioxidante de diversos extractos de plantas. El farneseno, compuesto mayoritario del extracto es un hidrocarbano sesquiterpeno acíclico ( $C_{15}H_{24}$ ), mayormente con propiedades insecticidas, inocuo para las plantas, animales superiores y para el hombre. Se ha reportado su presencia en diversas plantas, como el anís, manzanilla, lúpulo, lavanda, manzanas, entre otras, al cual se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, actividad anticarcinógena y más recientemente efectos antioxidantes *in vitro*. El  $\beta$ - pineno ( $C_{10}H_{16}$ ), uno de los compuestos mayoritarios del extracto, es un monoterpeneo bicíclico, presente en la gran mayoría de aceites esenciales, con reportes de actividad antioxidante *in vitro*. El extracto hexánico de *E. carlinae* demostró una mayor capacidad antioxidante



total, mediante la reducción del molibdeno Mo (VI) a Mo (V), a una concentración de 10.0 mg/mL<sup>-1</sup>, en comparación al estándar de ácido ascórbico (0.30mg/mL<sup>-1</sup>). En el ensayo de reducción el radical DPPH, el incremento de la concentración del extracto (0.30 mg/mL<sup>-1</sup>, 1.0 mg/mL<sup>-1</sup> y 10.0 mg/mL<sup>-1</sup>) aumentó el porcentaje en la reducción del DPPH; sin embargo, la actividad del estándar de ácido ascórbico fue mayor. En resultados obtenidos de la capacidad antilipoperoxidante, no existe diferencia significativa en la capacidad antilipoperoxidante mostrada por el ácido ascórbico (0.30 mg/mL<sup>-1</sup>), lo cual indica que el extracto puede evitar que las especies reactivas dañen las biomoléculas, específicamente ácidos grasos poliinsaturados [Peña, 2015].

| Compuesto              | Tiempo de retención (min) | Abundancia (%) | Compuesto              | Tiempo de retención (min) | Abundancia (%) |
|------------------------|---------------------------|----------------|------------------------|---------------------------|----------------|
| $\alpha$ -Pinoeno      | 6.79                      | 4.06           | (Z) $\beta$ -Farneseno | 22.64                     | 38.79          |
| $\beta$ -Pinoeno       | 7.96                      | 17.53          | Eudesmadieno           | 22.73                     | 1.73           |
| $\beta$ -Mirreno       | 8.34                      | 1.0            | Carotol                | 25.53                     | 1.40           |
| $\gamma$ -Terpineno    | 10.34                     | 2.23           | $\alpha$ -Bergamotol   | 27.79                     | 0.48           |
| $\alpha$ -Bergamoteno  | 21.31                     | 1.92           | $\alpha$ -Farneseno    | 29.09                     | 10.38          |
| (E) $\beta$ -Farneseno | 21.80                     | 1.65           | Calameneno             | 37.08                     | 13.30          |
| $\alpha$ -Cariofileno  | 21.86                     | 0.95           |                        |                           |                |

**Tabla 2.** Compuestos identificados en el extracto hexánico de la inflorescencia de *E. carlinae*. Tomado de Peña- Montes, 2015



#### 4. JUSTIFICACIÓN

La miocardiopatía diabética es una complicación ocasionada por la diabetes que se caracteriza por la presencia de **disfunción ventricular izquierda**. Existen estudios que ponen en evidencia que la hiperglucemia, la hiperlipidemia, la inflamación, la apoptosis y el estrés oxidativo derivado de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno están involucrados en la fisiopatología de la MCD. Los tratamientos que pueden reducir la hiperglucemia, la hiperlipidemia, el estrés oxidativo y el estrés nitrosativo han demostrado ser eficaces en la atenuación del desarrollo de la miocardiopatía diabética. La planta *E. carlinae* posee propiedades antioxidantes *in vitro* e hipolipidémicas *in vivo*, pero no ha sido evaluada su capacidad hipoglucémica y antioxidante *in vivo* en ratas con diabetes mellitus. Por lo anterior, es necesario evaluar estas últimas en un sistema biológico.

#### 5. HIPÓTESIS

La administración del extracto hexánico de la inflorescencia de *E. carlinae*, reduce los niveles de glucosa y lípidos, y posee actividad antioxidante en mitocondrias de corazón de ratas con diabetes.

#### 6. OBJETIVOS

##### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antioxidante, hipolipidémica e hipoglucemiante del extracto hexánico de la inflorescencia de *E. carlinae* en suero y la capacidad antioxidante del extracto en mitocondrias de ventrículo izquierdo de corazón de ratas con diabetes.

##### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el contenido de colesterol, triglicéridos y glucosa, y los niveles de lipoperoxidación en suero sanguíneo en ratas macho Wistar diabéticas tratadas con extracto hexánico de *Eryngium carlinae*.
2. Cuantificar los niveles de **óxido nítrico**, de **lipoperoxidación**, de **glutación reducido** y la actividad de la **superóxido dismutasa** (SOD), en las mitocondrias de ventrículo izquierdo del corazón de las ratas diabéticas tratadas.

3. Analizar los cambios morfológicos en cortes histológicos de ventrículo izquierdo del corazón de las ratas diabéticas tratadas.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 REACTIVOS**

Todos los reactivos y sustancias utilizadas fueron de grado reactivo y de la más alta calidad disponibles en el mercado (SIGMA-ALDRICH, J. T. BAKER, MERCK y FERMONT).

### **7.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO**

El material vegetal fue recolectado en la localidad de Santiago Undameo del Municipio de Morelia, Michoacán; posteriormente, se secó a temperatura ambiente. Se pesaron 300 g (peso seco) de la inflorescencia de *E. carlinae*; este material vegetal fue triturado y sometido a maceración con *n*-hexano (1:10 p/v) durante 7 días a 4 °C, protegido de la luz en recipientes cerrados herméticamente. El macerado se filtró en algodón, enseguida se concentró a presión reducida en un rotavapor a 40 °C y 90 rpm, en un matraz a peso constante. El extracto obtenido se resuspendió en *n*-hexano, se transfirió a un contenedor y se llevó a sequedad. Después, se almacenó a 4°C protegido de la luz hasta su uso [Peña *et al.*, 2016].

### **7.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

Los especímenes utilizados para el presente trabajo fueron ratas macho de la variedad Wistar con un peso corporal promedio de 270-330 g; se adaptaron durante 7 días en el bioterio del IIQB en cajas de acrílico a temperatura controlada con ciclos de 12 h luz/oscuridad, con alimento (Rat Chow, Purina) y agua *ad libitum*, siguiendo las recomendaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO” de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [Peña *et al.*, 2016].

### **7.4 INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

Las ratas se mantuvieron en ayuno de 18 h con agua *ad libitum*. Posteriormente, a cada rata se le suministró estreptozotocina (STZ) en una dosis ponderal de 45 mg/kg de peso corporal preparada *in situ* en buffer de citratos (0.1

M, pH 4.5) por vía intraperitoneal, y se mantuvo el ayuno durante dos horas, después se les reincorporó el alimento, finalmente se les retiró el alimento y se mantuvieron en ayuno durante 12 h monitoreándolas cada hora. Al quinto día se les determinó la concentración de glucosa con un glucómetro *Accu-Check Performa* (Roche); sólo los individuos con una concentración de glucosa  $\leq 300$  mg/dL fueron incluidos (los individuos control fueron tratados de la misma forma, inyectados por vía intraperitoneal únicamente con buffer de citratos 0.1 M, pH 4.5) [Peña *et al.*, 2016].

## 7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas se dividieron aleatoriamente en seis grupos. Tres de los grupos fueron controles, a dos de los cuales se les administró una dosis de 3.0 mg/Kg y 30.0 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*, respectivamente. Los tres grupos restantes fueron los grupos diabéticos, a dos de los cuales se les administró una dosis de 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*, respectivamente. El extracto fue emulsificado (Agua/Etanol 9:1) y se administró oralmente con una cánula intragástrica (Merck) diariamente durante 7 semanas. Al término del tratamiento las ratas se mantuvieron en ayuno de 12 h, y posteriormente, fueron sacrificadas por decapitación, la sangre total se colectó rápidamente en tubos y se obtuvo el suero y se almacenó a -20 °C, a través de una incisión vertical se aislaron los órganos (corazón) y se enjuagaron con solución fisiológica, se pesaron y almacenaron a -140 °C (Revco, Thermo Scientific) hasta su posterior uso [Peña *et al.*, 2016].

## 7.6 MÉTODOS

### 7.6.1 Parámetros bioquímicos en suero

La medición y cuantificación de glucosa, colesterol total y triglicéridos presentes en el suero de los especímenes biológicos en estudio, se realizó *in vitro* en el analizador automático VITROS DT60.

### 7.6.1.1 Determinación de glucosa

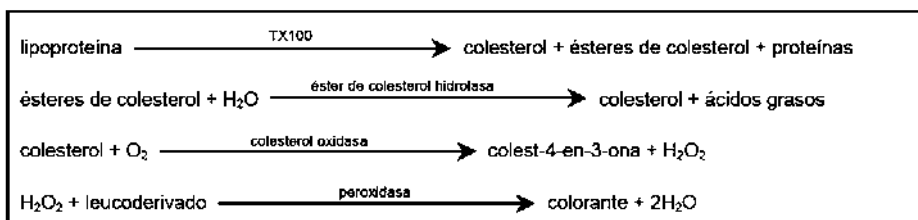
La determinación se realizó utilizando los slides VITROS GLU DT, colocando en cada slide 10  $\mu\text{L}$  de muestra. La oxidación de la glucosa contenida en la muestra está catalizada por la enzima glucosa oxidasa para formar peróxido de hidrógeno y gluconato. Esta reacción va seguida de un acoplamiento oxidativo catalizado por la enzima peroxidasa en presencia de precursores colorantes (1,7-dihidroxi-naftaleno y clorhidrato de 4-aminoantipirina) para producir un pigmento (figura 16). La intensidad del pigmento es medida de manera automática por el equipo a una absorbencia de 555 nm.



**Figura 16.** Secuencia de la reacción llevada a cabo para la determinación de glucosa en suero.  
Tomada de Products Vitros Chemistry Glu DT, 2003

### 7.6.1.2 Determinación de colesterol total

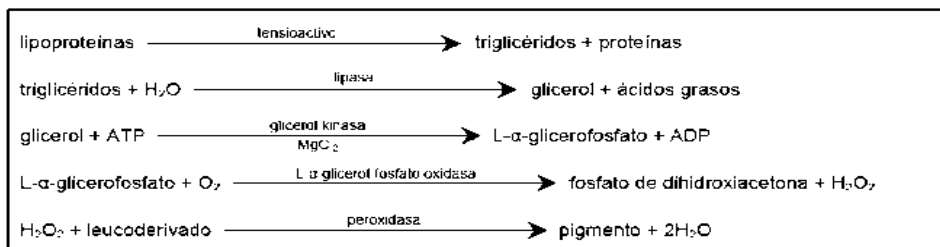
La cuantificación de colesterol total se realizó mediante los slides VITROS CHOL DT. A cada slide le fue colocada una gota de suero problema (10  $\mu\text{L}$ ). El tensioactivo Triton X-100 (TX100) contenido en la capa difusora ayuda a disociar el colesterol y los ésteres de colesterol de los complejos de lipoproteínas presentes en la muestra. La hidrólisis de los ésteres de colesterol a colesterol es catalizada por la éster de colesterol hidrolasa. Después, el colesterol libre es oxidado en presencia de colesterol oxidasa para formar colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. Por último, el peróxido de hidrógeno se oxida a un leucoderivado en presencia de peroxidasa para producir un colorante. La densidad del colorante formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra y se mide mediante espectrofotometría, a una absorbencia de 555 nm.



**Figura 17.** Secuencia de la reacción llevada a cabo para la determinación de colesterol en suero.  
Tomada de Products Vitros Chemistry Glu DT, 2003

### 7.6.1.3 Determinación de triglicéridos

La determinación se llevó a cabo utilizando slides VITRO TRIG DT. A cada slide le fueron añadidos 10  $\mu\text{L}$  de muestra. El tensioactivo Triton X-100 en la capa difusora ayuda a disociar los triglicéridos de los complejos de lipoproteínas presentes en la muestra. A continuación, las moléculas de triglicéridos son hidrolizadas por la lipasa para producir glicerol y ácidos grasos. El glicerol se difunde a la capa reactiva donde es fosforilado por la glicerol cinasa en presencia de trifosfato de adenosina (ATP). Después y en presencia de L- $\alpha$ -glicerol- fosfato oxidasa, el L- $\alpha$ - glicerofosfato es oxidado a fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. La reacción última implica la oxidación de un leucoderivado por el peróxido de hidrógeno para producir un colorante. La densidad del colorante formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra y se mide mediante espectrofotometría, a una absorbencia de 555 nm.

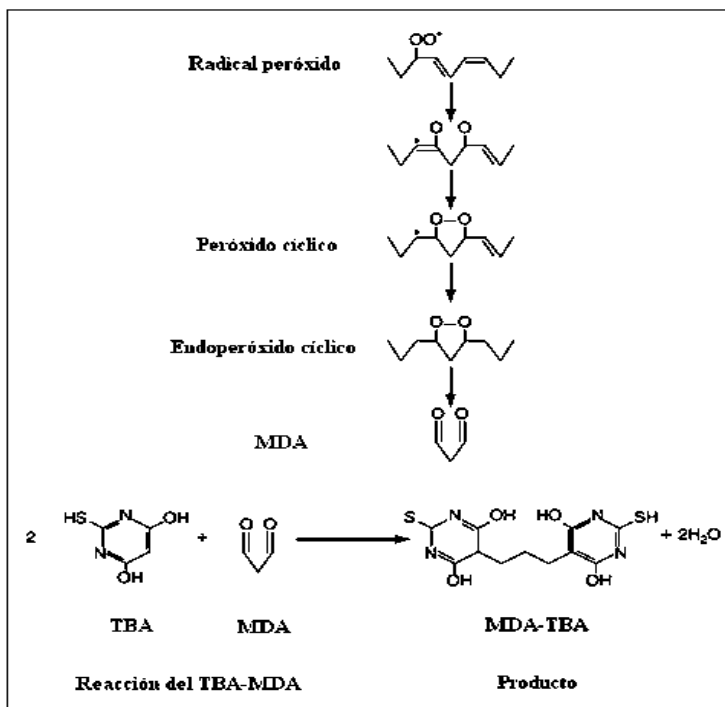


**Figura 18.** Secuencia de la reacción llevada a cabo para la determinación de triglicéridos en suero. Tomada de Products Vitros Chemistry TRIG DT, 2003

### 7.6.2 Determinación de lipoperoxidación en suero

Para su determinación se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust 1978). Por medio de este método se cuantifica la producción de sustancias reactivas al TBA (TBARS por sus siglas en ingles) de las cuales destaca el malondialdehído, principal producto de la oxidación de lípidos por radicales libres (Figura 19). El procedimiento se realizó por duplicado. Se realizó colocando en tubos de ensaye 1 mL de buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M pH 7.4), añadiendo 50  $\mu\text{L}$  del suero problema y 2 mL de solución ácida (ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N). Los tubos se llevan a baño de agua hirviendo durante 15 minutos, se dejan atemperar y se centrifugan a 5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante resultante es leído a una absorbencia de 535 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer. Los resultados fueron expresados en

nmolas de TBARS/mg de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



**Figura 19.** Formación del aducto MDA-TBA.

Se muestra la reacción en cadena de la lipoperoxidación, y el compuesto producido por el malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la lipoperoxidación y el ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual es cuantificado espectrofotométricamente a 532 nm. Tomado y modificado de Labudda, 2013.

### 7.6.3 Aislamiento y purificación de mitocondrias de corazón de rata

Se utilizó una modificación del método de aislamiento y purificación de mitocondrias de corazón de rata descrito por Moreno & Hansford (1988). Es necesario mencionar que los órganos se encontraban almacenados a una temperatura de  $-80^\circ \text{C}$  por un tiempo de seis meses. Para su procesamiento, cada corazón fue descongelado en medio de lavado (Hepes 5 mM, EGTA 5 mM, KCl 100 mM pH 7.4) en baño de hielo.

Cada corazón fue colocado en medio de lavado frío y se presionó suavemente con pinzas para extraer la mayor cantidad de sangre posible,

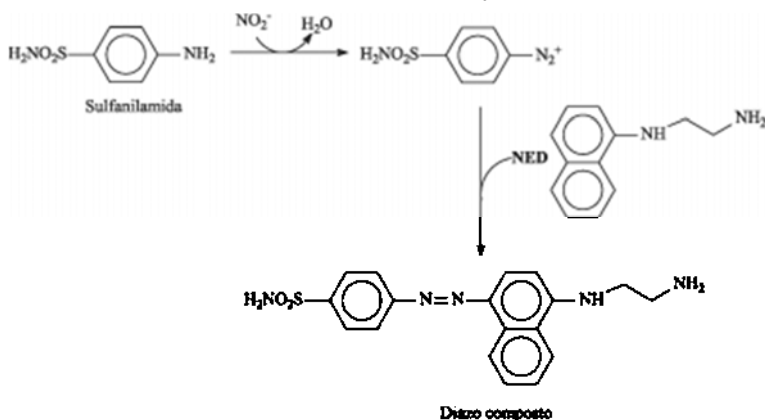
realizando dos lavados con el mismo medio. Enseguida, fue extraído del medio y se secó suavemente con papel, para pesarlo. Se registró el peso, se regresó al medio frío y se realizó una incisión con la finalidad de extraer la mayor cantidad de sangre posible. Se lavaron tres veces con aproximadamente 150 mL de medio de lavado, hasta lograr la desaparición de la coloración rojiza proveniente de la sangre en el medio. Se extrajo el corazón del medio, retirándole la grasa, coágulos, aurículas y fascia. Se realizó un corte transversal casi a la mitad del corazón, por debajo de las aurículas para retirarlas. Se realiza un segundo corte de aproximadamente 3 mm de ancho, de tal modo que pudieran observarse los ventrículos; dicho corte fue separado y almacenado en medio fijador Zamboni (PFA 8%, buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4, ácido pícrico saturado), para su posterior análisis histológico. A la fracción restante de los ventrículos le fue retirada la sección correspondiente al ventrículo derecho, conservando y procesando únicamente el izquierdo. Dicho ventrículo fue colocado en medio de lavado y cortado sobre una caja de Petri en baño de hielo en fragmentos de aproximadamente 1 mm. El tejido fue filtrado y lavado tres veces con medio de lavado frío, desechando el medio utilizado en cada lavado. Posteriormente, los fragmentos de corazón fueron transferidos al tubo homogenizador, lavando el vaso que contenía los fragmentos con medio SHE (Sacarosa 250 mM, Hepes-K 10 mM, EGTA-K 1 mM) para remover todo el tejido. Se procedió a homogenizar el tejido suavemente con pistón y taladro, manteniendo el tubo homogeneizador en baño de hielo. Una vez homogenizado el tejido, se dividió en dos tubos para centrifuga y fue añadida a cada tubo la enzima Proteasa (0.0083 ml/g de tejido) disuelta en medio SHE. La enzima se dejó incubar durante 5 minutos y enseguida se llevó a centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos para remover tejidos y restos celulares, a una temperatura de 4°C. El sobrenadante resultante se decantó en un tubo previamente frío y se guardó; la pastilla fue suavemente resuspendida en medio SHE y se llevó a centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a la misma temperatura. El sobrenadante resultante y el anterior se juntaron y centrifugaron a 8500 rpm durante 15 minutos a 4°C, mientras que la pastilla fue desechada. El sobrenadante se desecha, mientras que la pastilla resultante, correspondiente a las mitocondrias, fue suavemente resuspendida en 2 mL de medio SHE y se añadió albúmina bovina (50 mg/ml) como protector mitocondrial, dejándola incubar durante 10 minutos. Enseguida, se llevó nuevamente a centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha y la pastilla resultante fue suavemente resuspendida en 300 µL de medio SHE. Las mitocondrias fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

#### 7.6.4 Determinación de proteína mitocondrial

La cuantificación de proteína mitocondrial obtenida en cada aislamiento se llevó a cabo utilizando el método de Biuret (Layne, 1957). El procedimiento se realizó por duplicado. Para realizar la curva de calibración en tubos de ensaye, se agregaron los volúmenes correspondientes a 0, 0.5, 1, 2 y 4 mg de proteínas a partir de una solución patrón de 0.5 mg/ml de albúmina sérica bovina y se completaron con agua desionizada a 20  $\mu$ L. Para las muestras, se agregaron 20  $\mu$ L de éstas, y tanto a la curva de calibración como a las muestras se les añadieron 780  $\mu$ L de agua desionizada, 200  $\mu$ L de DOC y 2 mL del reactivo de Biuret. Los tubos se agitaron y se dejaron reposar protegidos de la luz durante 25 minutos. Se determinó la absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se construyó la curva de calibración en Excel (Microsoft Office) y por interpolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

#### 7.6.5 Determinación de la concentración de óxido nítrico

La determinación del óxido nítrico se llevó a cabo de manera indirecta, utilizando una modificación del método de Griess (Green y col. 1982). El método se basa en la reacción de diazotización de Griess para determinación espectrofotométrica en la detección de nitritos formados por la oxidación espontánea del óxido nítrico bajo condiciones fisiológicas (figura 20). La detección límite para este ensayo está entre 0.1 y 1  $\mu$ M de nitritos. Se cuantifica el nitrito, ya que es uno de los principales productos, estables y no volátiles del óxido nítrico.



**Figura 20.** Determinación indirecta del óxido nítrico.

Se muestra la reacción de nitritos (producto del metabolismo del óxido nítrico) con el reactivo de Griess, compuesto por sulfanilamida y N-1-naftiletilendiamina (NED), produciendo un compuesto AZO, que puede detectarse espectrofotométricamente a 540 nm (Green y col, 1982). Tomado y modificado de Ramos *et al.*, 2006.



El procedimiento se realizó por duplicado. Para determinar la concentración de óxido nítrico se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de  $\text{NaNO}_2$  (1.6 mM, 6.25 mM, 25 mM, 100 mM y 200 mM), completando a un volumen de 550  $\mu\text{L}$  con medio para la determinación de NO (MOPS 75 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, KCl 15 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Manitol 220 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4). En el caso de las muestras, en tubos Eppendorf fue colocado 1 mg de proteína mitocondrial, completando hasta un volumen final de 1000  $\mu\text{L}$  con medio para la determinación de NO. Se le añadieron 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4$  al 0.4% y se dejaron permeabilizar durante 10 minutos. Tanto los tubos para la curva de calibración, como las muestras, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Del sobrenadante resultante, se tomaron 550  $\mu\text{L}$  y fueron transferidos a tubos Eppendorf protectores de la luz, añadiendo 150  $\mu\text{L}$  de HCl al 5%, 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{VCl}_3$ , 75  $\mu\text{L}$  de NED al 0.1% y 75  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida. Se incubaron a 37 °C en baño de agua durante 30 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante fue leído a una longitud de onda de 546 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. La concentración de óxido nítrico se calculó mediante la gráfica obtenida de la curva patrón.

#### **7.6.6 Determinación de la lipoperoxidación mitocondrial**

Para su determinación se utilizó una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust 1978), mismo que se describió en la misma determinación en suero. El procedimiento se realizó por duplicado. Se realizó colocando en tubos de ensaye 1 mL de buffer de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M pH 7.4), añadiendo lo equivalente a 500 mg de proteína mitocondrial y 2 mL de solución ácida (ácido tricloroacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N). Los tubos se agitan en vórtex y se llevan a baño de agua hirviendo durante 15 minutos, se dejan atemperar y se centrifugan a 5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante resultante es leído a una longitud de onda de 535 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer. Los resultados fueron expresados en nmolas de TBARS/mg de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

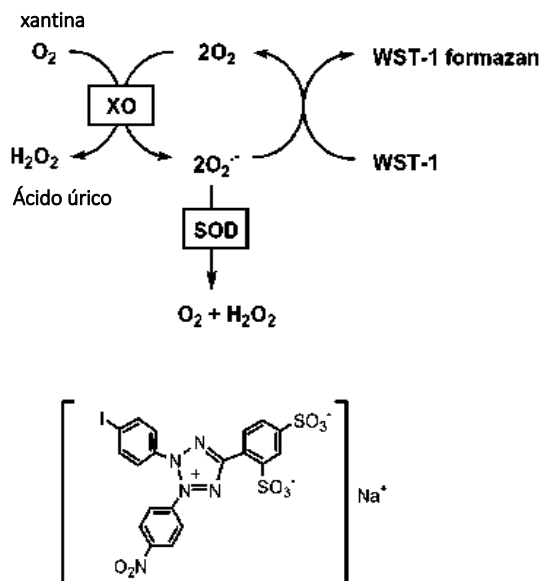
#### **7.6.7 Determinación de glutatión reducido mitocondrial**

La determinación del glutatión reducido (GSH) se realizó por el método de Jollow *et al.* (1974) con algunas modificaciones, la cual consiste en la reducción del cromógeno (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)) (DTNB) o reactivo de Ellman y la subsecuente formación del dianión 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB), el cual presenta una coloración amarilla con un pico de absorción a 412 nm. Todos los

procedimientos se realizaron por duplicado. Para la cuantificación del GSH se añadió en tubos de ensaye lo equivalente a 200 mg de proteína mitocondrial, agregando 1.0 mL de buffer de fosfato disódico (0.1 M, pH 8.0) y después se le añadió 0.4 mL del reactivo de Ellman (DTNB 10mM, en buffer de fosfato disódico 0.1 M, pH 8.0) y se incubó durante 5 minutos. El sobrenadante fue leído a una longitud de onda de 412 nm usando un espectrofotómetro UV/Vis Perkin- Elmer. Los resultados fueron expresados utilizando el coeficiente de extinción molar del 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) ( $14.14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) entre la concentración de proteína ( $\mu\text{M/g}$  de proteína).

#### **7.6.8 Medición de la actividad de la superóxido dismutasa**

La actividad de esta enzima fue cuantificada utilizando el kit para determinación de SOD (19160, SIGMA-ALDRICH, 2014). El principio de la metodología empleada es la cuantificación espectrofotométrica de la oxidación del colorante WST (water soluble tetrazolium salt) (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) a WST-formazan por los iones superóxido formados mediante el conjunto xantina (XO)/xantina (X) oxidasa. La inhibición en la oxidación del WST es atribuida a la neutralización de los radicales superóxido por la SOD (figura 21). En este método, el  $\text{O}_2^-$  reduce al WST-1 para producir el formazan amarillo, que se mide espectrofotométricamente a 450nm. Los antioxidantes, en este caso la enzima SOD, son capaces de inhibir la formación del WST amarillo.



**Figura 21.** Principio del kit de determinación de SOD.

Se muestra la reducción del WST-1 a WST- formazan por el anión  $O_2^{\bullet -}$ , reacción que es inhibida por la acción de la SOD. La formación del WST-1 se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Tomado y modificado del kit para la determinación de SOD, 19160, Sigma- Aldrich, 2014.

El procedimiento se realizó por duplicado. Las soluciones de trabajo fueron preparadas según las instrucciones indicadas en el kit. En placa ELISA, fue colocado lo equivalente a 300 mg de proteína mitocondrial por cada muestra, agregando 200  $\mu$ L de solución de trabajo y se mezcló, para enseguida añadir 20  $\mu$ L de solución enzimática, se mezcló vigorosamente y se llevó a incubación a 37 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo indicado, la absorbencia se leyó espectrofotométricamente a 450 nm. Simultáneamente, fueron preparados 3 blancos, dos de ellos controles positivo y negativo, respectivamente, y el tercero destinado a eliminar la interferencia que pudiera provocar el medio en que fueron resuspendidas las mitocondrias tras su aislamiento. Para los controles, fueron colocados 20  $\mu$ L de agua destilada, agregando 200  $\mu$ L de solución de trabajo, se mezcló, y al control positivo se le agregaron 20  $\mu$ L de solución enzimática, mientras que al control negativo se añadieron 20  $\mu$ L de buffer de dilución. Para el tercer control, se colocaron 20  $\mu$ L de medio SHE, agregando 200  $\mu$ L de solución de trabajo y se mezcló, agregando enseguida 20  $\mu$ L de solución enzimática. Los tres controles fueron agitados vigorosamente e incubados y leídos en las mismas condiciones que las muestras.

Para determinar la concentración de SOD, se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de la enzima (0 U/mL, 5 U/mL, 10 U/mL, 20 U/mL y 50 U/mL, 100 U/mL y 200 U/mL). La actividad enzimática se calculó mediante la gráfica obtenida de la curva patrón.

## **7.6.9 Histología**

### **7.6.9.1 Inclusión en parafina**

Para la realización de la inclusión en parafina de las muestras para su posterior análisis histológico, es necesario mencionar que una vez separado el tejido destinado para este análisis, fue sumergido y almacenado en fijador Zamboni (PFA 8%, buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4, ácido pícrico saturado). La técnica utilizada fue extraída del manual "Métodos Histotecnológicos" de Prophet y cols., del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) 1995.

Los cortes de corazón fueron extraídos del fijador y colocados en casetes para histología. Los casetes fueron sumergidos en etanol al 70% a temperatura ambiente durante 10 minutos, repitiendo el procedimiento cuatro veces y desechando el alcohol utilizado en cada repetición, con la finalidad de remover el ácido pícrico contenido en el fijador. Enseguida, se sumergieron los casetes en etanol al 96% durante toda la noche a la misma temperatura. Se procedió a transferir los casetes a etanol limpio al 96% a 60°C durante una hora, manteniendo la misma temperatura a lo largo del procedimiento restante mediante un horno. Luego, los casetes fueron cambiados a etanol absoluto a la misma temperatura durante media hora, cambiándolos nuevamente a etanol absoluto limpio durante media hora más. Entonces, los casetes fueron transferidos a una mezcla de xileno/etanol absoluto (50/50) durante una hora, pasándolos después a xilol por media hora y transfiriéndolos nuevamente a xilol limpio por media hora más. Enseguida los casetes fueron cambiados a parafina durante media hora, y transferidos por último a parafina limpia. En ésta, se dejaron durante toda la noche, manteniendo la temperatura del proceso, 60 °C. Luego, se procedió a incluir las muestras en parafina.

### **7.6.9.2 Corte del tejido mediante micrótomos**

Las muestras incluidas en parafina fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta ser cortadas mediante un microtomo marca Leica RM2125 RTS, a un grosor de 5 µm. Los cortes fueron fijados en portaobjetos previamente gelatinizados y almacenados a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

### 7.6.9.3 Tinción del tejido

La tinción de los cortes de ventrículo izquierdo del corazón de rata se llevó a cabo utilizando la tinción con Hematoxilina-Eosina. La hematoxilina, un colorante natural, fue usada por primera vez alrededor de 1863. El agente colorante activo, la hemateína, se forma por la oxidación de la hematoxilina, proceso que ocurre espontáneamente si las soluciones de hematoxilina se dejan en reposo por varios días, o usando agentes oxidantes como el yodato de sodio o el óxido de mercurio [Prophet et al., 1995].

El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilos) en tonos de azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina, que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma.

Previamente a su tinción, los portaobjetos que contenían las muestras se colocaron en una plancha a 80°C durante 20 minutos para eliminar los excesos de parafina. Enseguida las laminillas fueron sumergidas en xileno para realizar una desparafinización completa de las muestras, pasando cada laminilla por dos soluciones de xileno. Posteriormente, cada laminilla se sumergió y se retiró en alcohol absoluto, nuevamente se sumergió en distinto alcohol absoluto, luego en dos alcoholes distintos al 95%, luego en alcohol al 80% y luego en agua destilada, para enseguida ser pasada a la hematoxilina durante 3 minutos. Transcurrido el tiempo, se pasó por agua corriente, agua destilada, alcohol al 80% y solución de eosina, sumergiendo la laminilla y sacándola enseguida. Se procedió a sumergir y retirar la laminilla en dos alcoholes distintos al 95%, dos alcoholes al 100%, dos xilenos distintos y se procedió al montaje final, las cuales se montaron en resina para su posterior observación y análisis en el microscopio.

### 7.6.10 Análisis estadístico

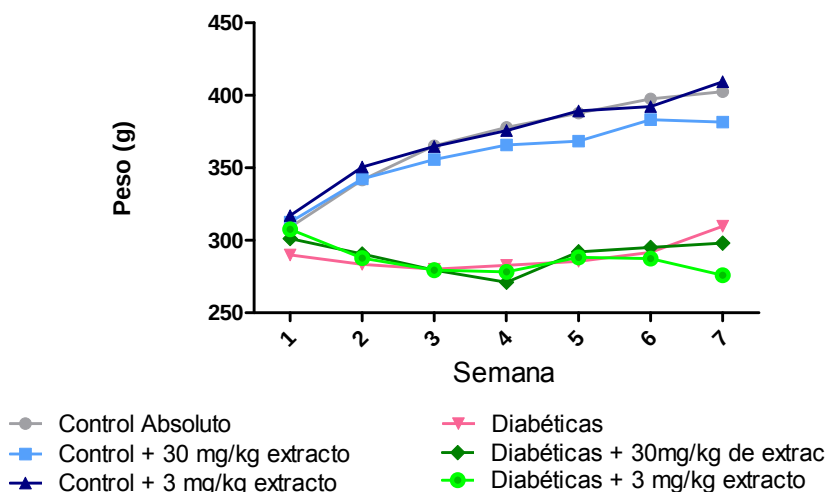
Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y los resultados fueron sometidos a la prueba *t Student* para determinar la significancia ( $p < 0.05$ ) de la diferencia entre los valores promedio, utilizando el programa *Graph Pad Prism 6*.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 PESO DE LOS ESPECÍMENES

El peso corporal de cada espécimen se registró cada semana durante 7 semanas. En la gráfica 1 se muestra la gráfica representativa del peso de los especímenes durante el tratamiento a las diferentes concentraciones (Sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos.

Los grupos no diabéticos mostraron una marcada tendencia a aumentar su peso corporal, mientras que los grupos diabéticos muestran el efecto contrario, situación atribuible al correcto establecimiento del modelo diabético experimental. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en tratamiento, tanto diabéticos como controles, por lo que el extracto no tuvo repercusiones en el peso corporal de los animales.

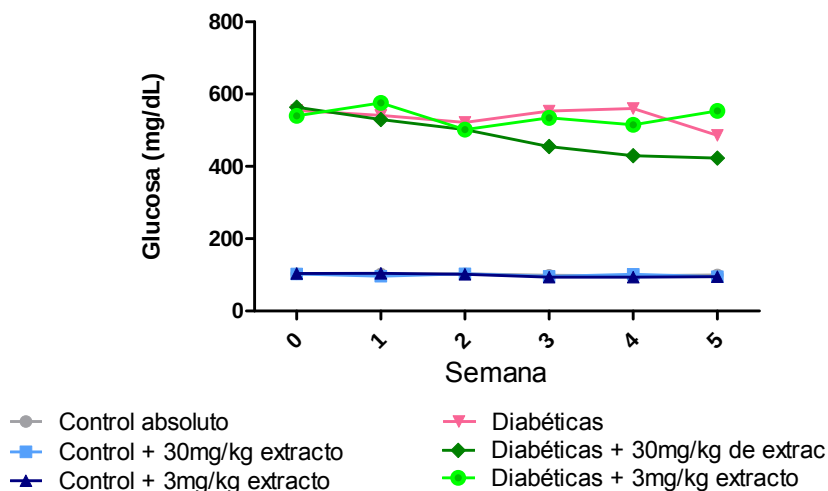


**Gráfica 1.** Gráfica representativa del peso de los especímenes en tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*. Los pesos obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

## 8.2 GLUCEMIA DURANTE EL TRATAMIENTO

La concentración de glucosa de cada espécimen se registró cada semana durante las siete semanas de tratamiento con un glucómetro *Accu-Check Performa* (Roche) a través de una punción en la punta de la cola. En la gráfica 2 se muestran los niveles de glucosa de los especímenes durante el tratamiento a las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos.

Los grupos no diabéticos no exhibieron variaciones significativas en sus niveles de glucosa, manteniendo éstos dentro de los parámetros de referencia. Los grupos diabéticos muestran niveles superiores a los parámetros de referencia, situación que confirma el correcto establecimiento del modelo diabético experimental. A lo largo del tratamiento, el grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal del extracto hexánico de *E. carlinae* muestra una tendencia a la disminución en los niveles de glucemia en comparación al grupo diabético sin tratamiento, tendencia que no resultó estadísticamente significativa.

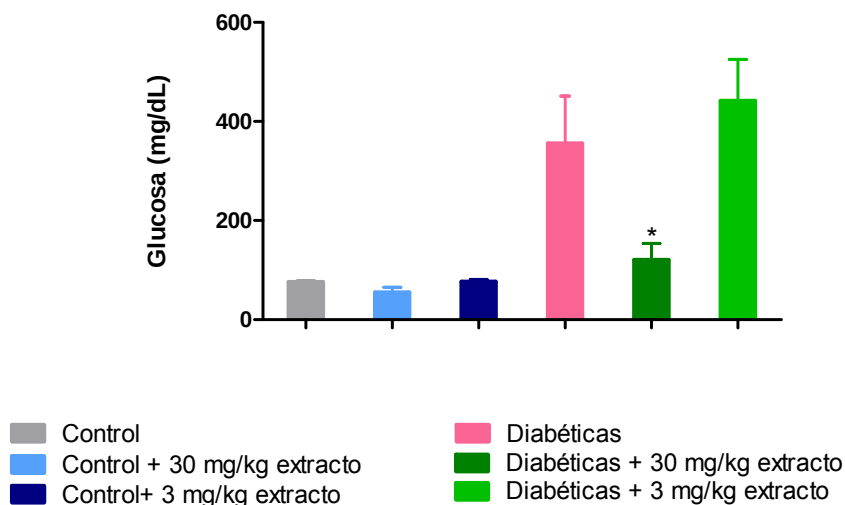


**Gráfica 2.** Gráfica representativa de la concentración de glucosa de los especímenes durante el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*. Los niveles de glucemia obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

### 8.3 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO

La determinación se realizó utilizando los slides VITROS GLU DT y el analizador automático VITROS DT60. En la gráfica 3 se muestran los niveles de glucosa al finalizar el tratamiento, en el suero de los especímenes a las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos.

Los grupos no diabéticos no exhibieron variaciones significativas en sus niveles de glucosa, manteniendo éstos dentro de los parámetros de referencia. El grupo diabético tratado a una concentración de 3.0 mg/kg del extracto no mostró cambios significativos. En contraste, el grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal del extracto hexánico de *E. carlinae* muestra una disminución significativa ( $p<0.05$ ) del nivel de glucosa, con respecto al grupo diabético sin tratamiento. Lo anterior pone en evidencia un efecto hipoglucemiante por parte del extracto.



**Gráfica 3.** Gráfica de la concentración de glucosa en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*. Los niveles de glucemia obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p<0.05$ ).

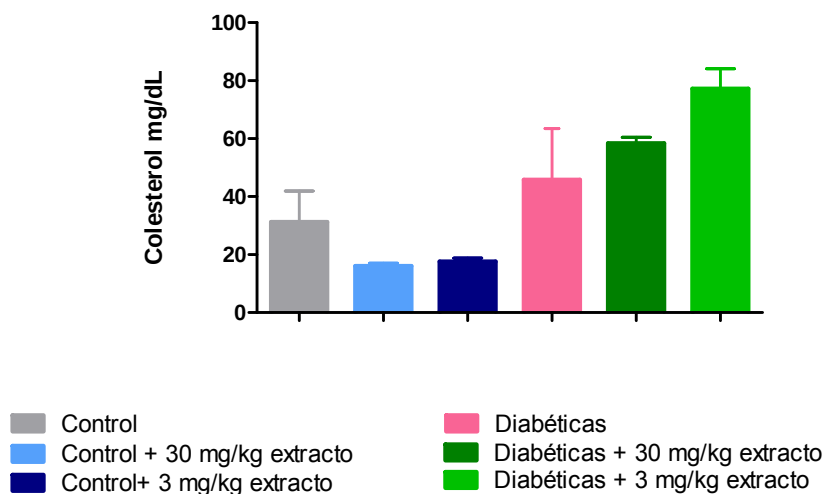
\* Grupo diabético sin tratamiento vs grupo diabético tratado con 30 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*.



#### 8.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

La determinación se realizó utilizando los slides VITROS CHOL DT y el analizador automático VITROS DT60. En la gráfica 4 se muestran los niveles de colesterol total en el suero de los especímenes a las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos.

En los grupos no diabéticos se observa una tendencia de los niveles de colesterol a disminuir, mientras que se observa el efecto contrario en los grupos diabéticos con y sin tratamiento. Sin embargo, ninguna de estas variaciones resultó estadísticamente significativa, ni en los grupos controles ni en los grupos en tratamiento, por lo que el extracto hexánico de *E. carlinae* no tuvo efectos representativos en los niveles de colesterol de los grupos en tratamiento.

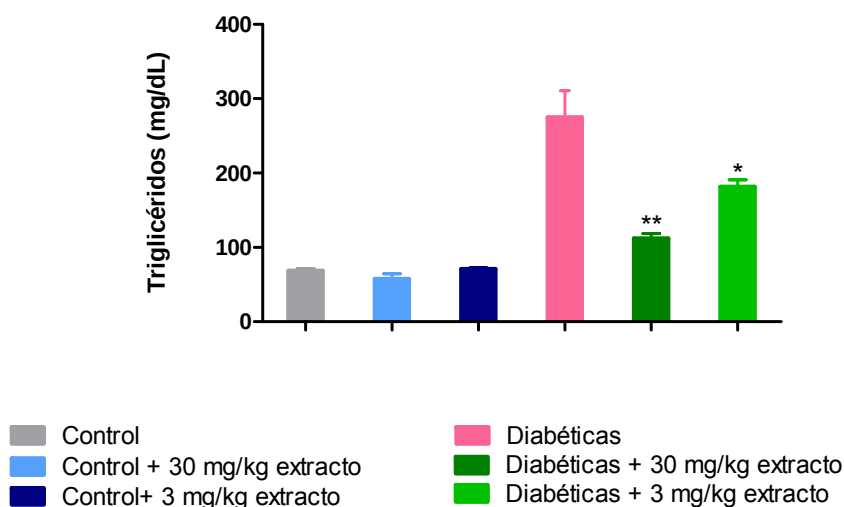


**Gráfica 4.** Gráfica de los niveles de colesterol total en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*. Los niveles de colesterol obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

## 8.5 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

La determinación se realizó utilizando los slides VITROS TRIG DT y el analizador automático VITROS DT60. En la gráfica 5 se muestra los niveles de triglicéridos en el suero de los especímenes a las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos.

Los grupos no diabéticos no mostraron variaciones significativas en los niveles de triglicéridos totales, manteniéndose dentro de los parámetros de referencia. El grupo diabético sin tratamiento muestra un aumento importante en los niveles de triglicéridos, situación que es característica de la enfermedad. Tanto el grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg, como el grupo diabético tratado a una concentración de 3 mg/kg de peso corporal del extracto hexánico de *E. carlinae* muestran una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de los niveles de triglicéridos, con respecto al grupo diabético sin tratamiento. Lo anterior exhibe un efecto hipolipemiente por parte del extracto.



**Gráfica 5.** Gráfica de los niveles de triglicéridos en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*.

Los niveles de triglicéridos obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

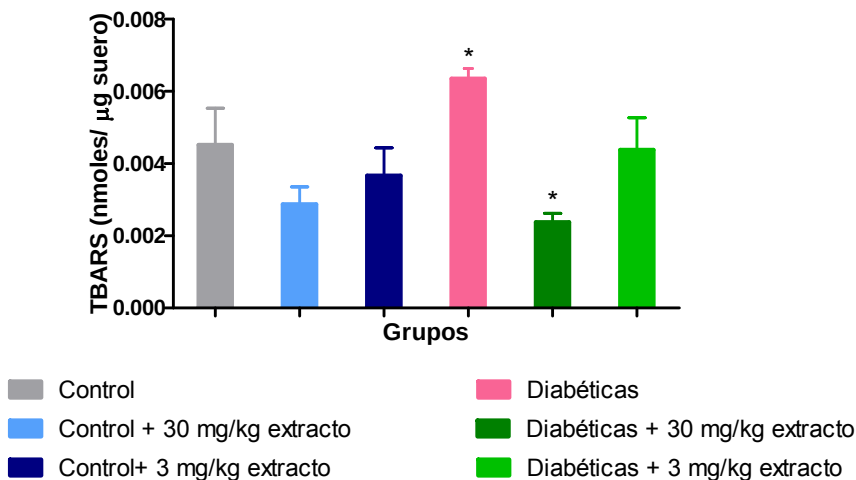
\* Grupo diabético sin tratamiento vs grupo diabético tratado con 3 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*.

\*\* Grupo diabético sin tratamiento vs grupo diabético tratado con 30 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*.

## 8.6 DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN EN SUERO

Para evaluar el daño oxidativo en los lípidos de membrana presentes en el suero de los especímenes, se determinaron los niveles de lipoperoxidación por medio de la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico antes descrito. Los resultados se expresan en niveles de TBARS (nmoles/ $\mu\text{g}$  suero) para las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos (gráfica 6).

En los grupos sin diabetes se observa una tendencia a la disminución en los niveles de lipoperoxidación, especialmente en el grupo tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto, sin que estas diferencias hayan sido significativas. Respecto a los grupos con diabetes, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal mostró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de los niveles de lipoperoxidación en comparación al grupo diabético sin tratamiento. Lo anterior pone de manifiesto un efecto antioxidante del extracto hexánico de *E. carlinae* en el suero de ratas diabéticas.



**Gráfica 6.** Gráfica de los niveles de lipoperoxidación en el suero de los especímenes al finalizar el tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*.

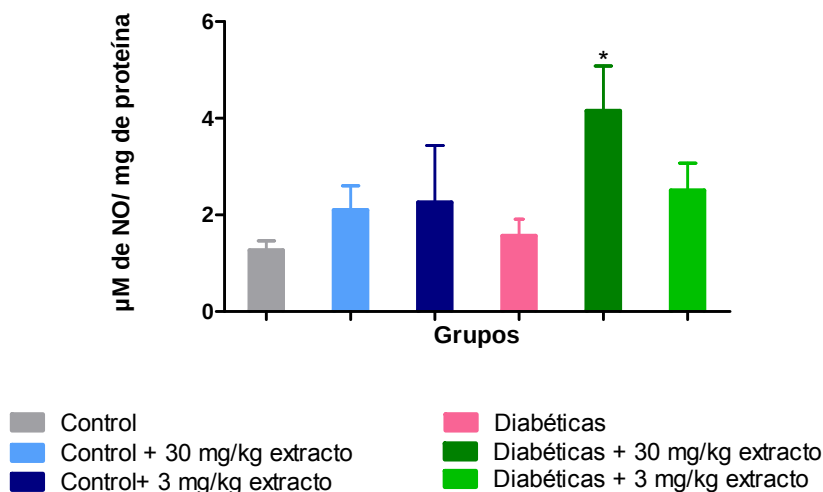
Los niveles de lipoperoxidación obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

\* Grupo diabético sin tratamiento vs grupo diabético tratado con 30 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*

## 8.7 DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL

Para evaluar el estrés nitrosativo, se determinaron los niveles de NO de manera indirecta, por medio de una modificación del método de Griess (Green y col. 1982) antes descrito. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles}$  de NO/mg de proteína mitocondrial para las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos (gráfica 7).

En los grupos sin diabetes se observa una tendencia al aumento de los niveles de NO, sin que esta tendencia resulte estadísticamente significativa. Respecto a los grupos con diabetes, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal reflejó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los niveles de NO en comparación al grupo diabético sin tratamiento. Sin embargo, el grupo diabético tratado a una concentración de 3 mg/kg de extracto mostró una disminución de los niveles de NO, respecto al grupo tratado a una concentración de 30 mg/kg de extracto, sin que esta disminución resulte significativa. El aumento en los niveles de NO por parte del grupo diabético tratado a 30 mg/kg del extracto puede traducirse en el aumento en la biodisponibilidad del NO, lo que podría contribuir a la disminución del estrés oxidativo y esto podría conllevar un efecto protector endotelial.



**Gráfica 7.** Gráfica de los niveles de óxido nítrico mitocondrial a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*.

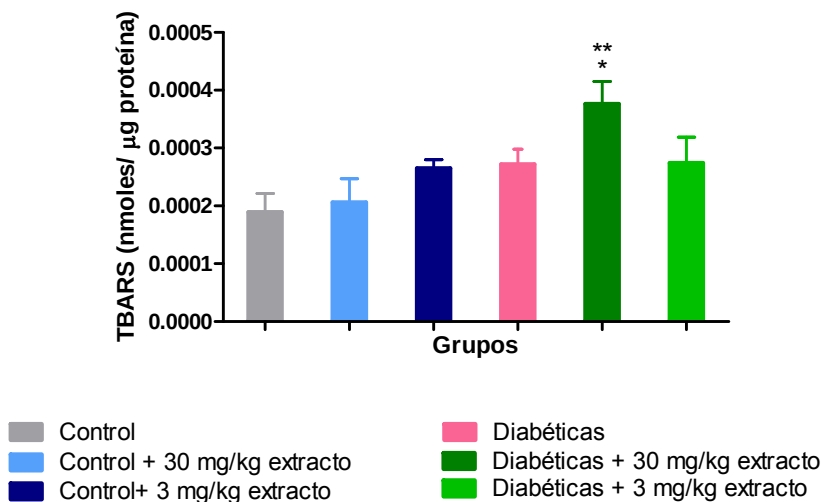
Los niveles de NO obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

\* Grupo diabético sin tratamiento vs grupo diabético tratado con 30 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*.

## 8.8 DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL

Para la evaluación del daño oxidativo en los lípidos de membrana presentes en las mitocondrias de ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes, se determinaron los niveles de lipoperoxidación por medio de la técnica de TBARS, antes descrita. Los resultados se expresan en niveles de TBARS (nmoles/  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial) para las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos (gráfica 8).

En los grupos sanos se observó un aumento en los niveles de lipoperoxidación mitocondrial, sin que estas diferencias hayan sido significativas. Respecto a los grupos con diabetes, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal mostró un aumento significativo de los niveles de lipoperoxidación mitocondrial en comparación al grupo diabético sin tratamiento. Además, resultó significativo el aumento en los niveles de TBARS del grupo diabético tratado con 30 mg/kg del extracto, respecto al grupo control tratado a la misma concentración del extracto. Lo anterior exhibe que el extracto hexánico de *E. carlinae* no posee efecto antioxidante a nivel mitocondrial.



**Gráfica 8.** Gráfica de los niveles de lipoperoxidación mitocondrial a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*.

Los niveles de TBARS obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

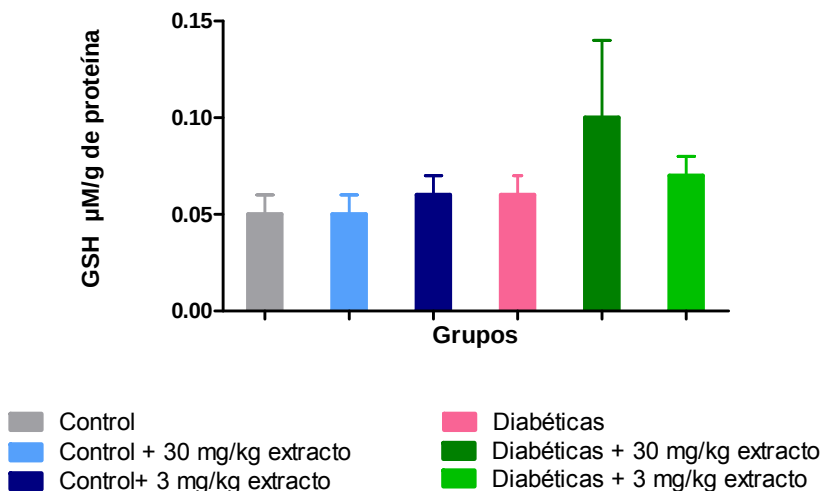
\* Grupo diabético sin tratamiento vs grupo diabético tratado con 30 mg/kg de extracto hexánico de *E. carlinae*

\*\* Control tratado a 30 mg/kg de extracto vs grupo diabético tratado con 30 mg/kg del extracto hexánico de *E. carlinae*

## 8.9 DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO MITOCONDRIAL

Para la evaluación de la capacidad antioxidante mitocondrial, se cuantificó el glutatión reducido (GSH) de los grupos diabéticos en tratamiento con respecto a los controles, siguiendo el método de Jollow *et al.* (1974) antes descrito. Los resultados se expresan como la concentración de GSH para las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos (gráfica 9).

Respecto a los grupos controles, el grupo tratado a una concentración de 3 mg/kg de peso corporal del extracto presentó un ligero aumento en los niveles de GSH, sin que este aumento haya resultado estadísticamente significativo. El grupo tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto, no mostró variaciones respecto a su control. En los grupos con diabetes, el grupo tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto mostró un evidente incremento en los niveles de GSH respecto a los demás grupos diabéticos, sin que dicho incremento resultara estadísticamente significativo. El grupo tratado con 3 mg/kg del extracto mostró un aumento de dichos niveles con respecto al grupo diabético sin tratamiento, pero dicho aumento no fue estadísticamente significativo. El extracto hexánico de *E. carlinae* no tuvo efectos representativos en los niveles de GSH de los grupos en tratamiento.

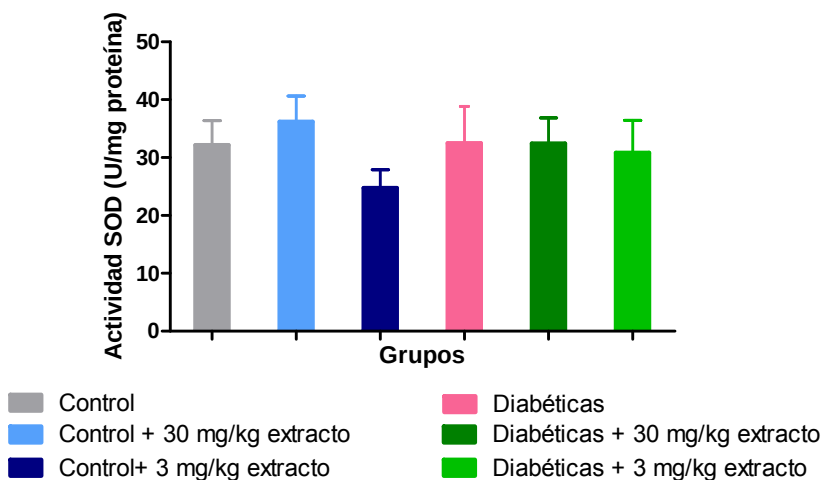


**Gráfica 9** Gráfica de los niveles de glutatión reducido (GSH) mitocondrial de los especímenes en tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*. Los niveles de GSH obtenidos se analizaron mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ )

### 8.10 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) MITOCONDRIAL

La actividad de esta enzima fue cuantificada utilizando el kit para determinación de SOD (19160, SIGMA-ALDRICH, 2014), siguiendo el método descrito para ello. Los resultados se expresan como actividad de la SOD (U/mg proteína) para las diferentes concentraciones (sin tratamiento, 3.0 mg/kg y 30.0 mg/kg de peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae* en los diferentes grupos (gráfica 10).

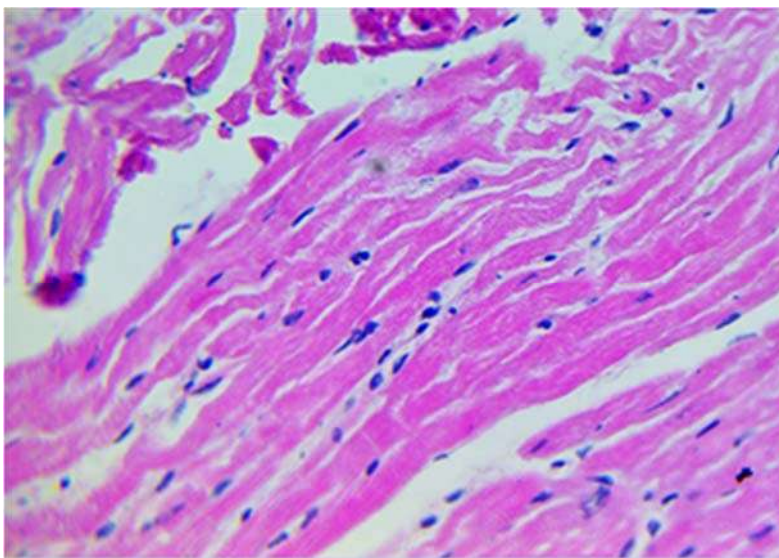
En los grupos sin diabetes, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 3 mg/kg de peso corporal mostró una disminución en la actividad de la enzima SOD, sin que esta disminución resultara significativa. Respecto a los grupos con diabetes, no se observan diferencias significativas en la actividad antioxidante de la SOD. Lo anterior exhibe que el extracto hexánico de *E. carlinae* no posee efecto sobre la actividad antioxidante de la enzima SOD a nivel mitocondrial.



**Gráfica 10.** Gráfica de la actividad de la enzima SOD mitocondrial de los especímenes en tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto hexánico de *E. carlinae*. La actividad obtenida se analizó mediante la prueba *t* Student ( $p < 0.05$ ).

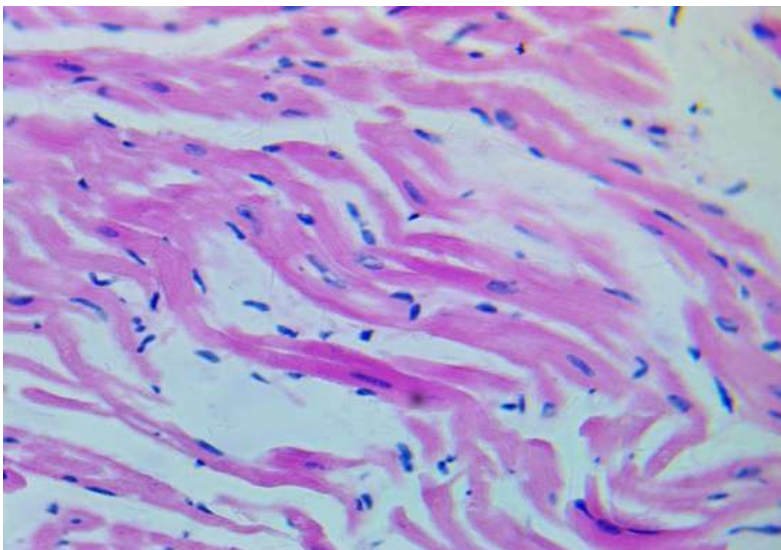
### 8.11 HISTOLOGÍA

Los cortes histológicos de ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes fueron teñidos utilizando la tinción Hematoxilina-Eosina, mediante el procedimiento previamente descrito. El análisis de cada muestra se llevó a cabo mediante microscopía óptica virtual, obteniendo la mejor visualización del tejido utilizando el objetivo de 40x. Las figuras siguientes muestran las imágenes obtenidas al microscopio, en el orden: grupo control, control tratado a una concentración de 30 mg/kg (peso corporal) del extracto hexánico de *E. carlinae*, control tratado con 3 mg/kg del extracto, grupo diabético, diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg de extracto, diabético tratado a 3 mg/kg (peso corporal) del extracto.

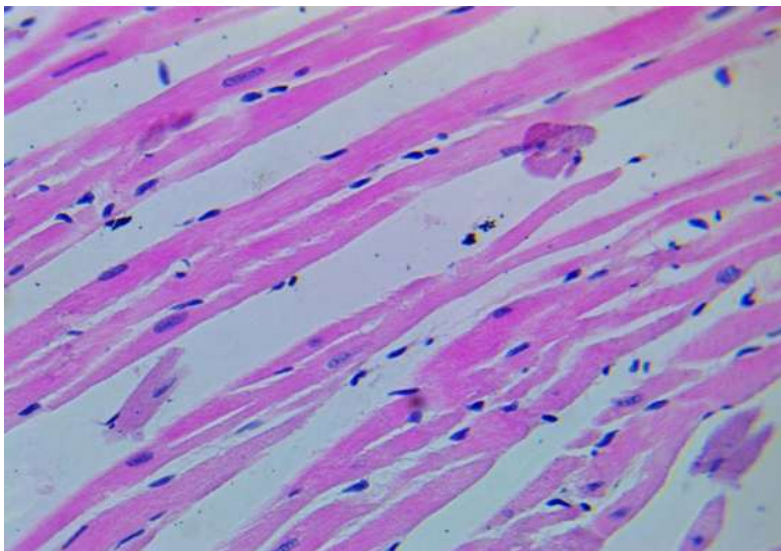


**Figura 22.** Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo control sin tratamiento. Tinción hematoxilina y eosina. Tomada a una resolución de 40x.

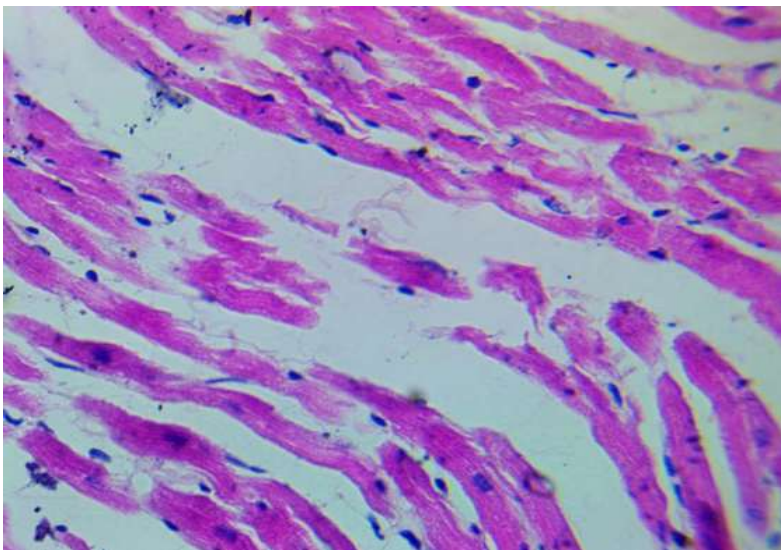




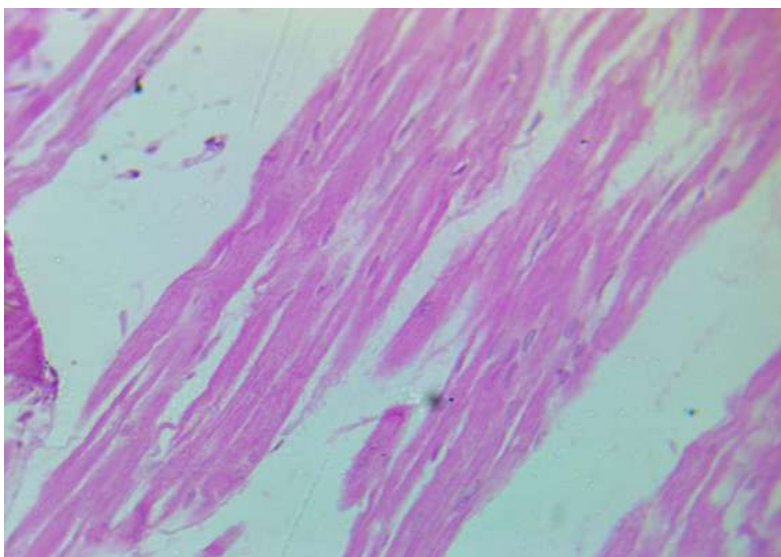
**Figura 23.** Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo control tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto hexánico de *E. carlinae*. Tinción hematoxilina y eosina. Tomada a una resolución de 40x



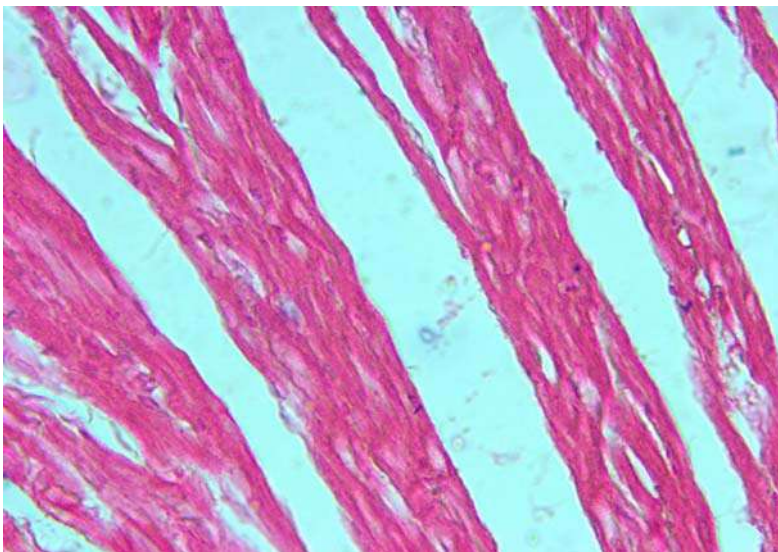
**Figura 24.** Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo control tratado a una concentración de 3 mg/kg del extracto hexánico de *E. carlinae*. Tinción hematoxilina y eosina. Tomada a una resolución de 40x



**Figura 25.** Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo diabético sin tratamiento. Tinción hematoxilina y eosina. Tomada a una resolución de 40x



**Figura 26.** Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto hexánico de *E. carlinae*. Tinción hematoxilina y eosina. Tomada a una resolución de 40x



**Figura 27.** Microfotografía de corte histológico de ventrículo izquierdo de corazón de rata, correspondiente al grupo diabético tratado a una concentración de 3 mg/kg del extracto hexánico de *E. carlinae*.

Tinción hematoxilina y eosina. Tomada a una resolución de 40x.

El análisis histológico reveló la presencia de hipertrofia celular en el grupo diabético sin tratamiento, puesta en evidencia debido al aumento en el tamaño de los miocardiocitos, así como en el aumento en el tamaño de los núcleos e irregularidades en la membrana nuclear, lo que concuerda con lo reportado por Díez *et al.*, 2017. Este patrón hipertrófico de los miocardiocitos no fue observado en los grupos control, ni en los grupos diabéticos tratados a las distintas concentraciones del extracto. Lo anterior, es evidencia de un posible efecto protector a nivel histológico del extracto hexánico de *E. carlinae*.

## 9. DISCUSIÓN

La diabetes es un problema de salud mundial. Según se estima, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980 [OMS, 2016], lo que implica que el número de personas con diabetes aumentó casi cuatro veces en tan sólo tres décadas. La prevalencia mundial de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4.7% al 8.5% en la población adulta. En 2012, la diabetes provocó 1.5 millones de muertes. Un nivel de glucosa en la sangre superior al deseable provocó otros 2.2 millones de muertes, al incrementar los riesgos de enfermedades cardiovasculares y de otro tipo [OMS, 2016]. En México, desde el año 2000 la diabetes ocupa el primer lugar como causa de muerte general [Rojas *et al.*, 2015]. Los datos de la ENSANUT de medio camino 2016, identifican al 9.4% de los adultos en México diagnosticados con diabetes, observándose un incremento en la prevalencia con respecto a la ENSANUT 2012 (9.2%) y a la ENSANUT 2006 (7.2%).

La DM y sus complicaciones constituyen poderosos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares [Pastor-Luna *et al.*, 2011]. Existe una fuerte correlación entre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la DM: al menos el 68% de las personas diabéticas mayores de 65 años mueren de enfermedades cardíacas y el 16% de apoplejía. Los adultos con DM son de 2 a 4 veces más susceptibles a sufrir enfermedades del corazón o apoplejías que los adultos sin diabetes, aun cuando la enfermedad está controlada [Torres- Herrera, 2012]. La DM multiplica por cuatro el riesgo de muerte de causa cardiovascular. La morbilidad y mortalidad asociada con la DM tipo 2 son innegablemente de naturaleza cardiovascular [Pastor-Luna *et al.*, 2011].

Evidencia clínica, epidemiológica e histopatológica indican la existencia de una cardiopatía específica relacionada con la diabetes mellitus. [Ferreira-Braga *et al.*, 2005]. La miocardiopatía diabética es una complicación ocasionada por la diabetes que se caracteriza por la presencia de **disfunción ventricular izquierda**. Estudios previos han demostrado que la hiperglicemia, hiperlipidemia, inflamación, apoptosis y el estrés oxidativo probablemente están involucrados en la fisiopatología de la MCD. El daño al corazón diabético está íntimamente relacionado con disfunción mitocondrial, así como incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno. El daño mitocondrial consistente observado en el corazón diabético indica una falla en el control de calidad de éstas. Las mitocondrias disfuncionales pueden generar mayor producción de ROS y desatar factores que favorecen la muerte de los cardiomiocitos.

Diversos agentes que contrarrestan ROS o antioxidantes pueden tener la capacidad de reducir la muerte de los cardiomiocitos y atenuar el daño al corazón diabético en modelos animales experimentales [Liang & Kobayashi, 2015].

*Eryngium carlinae* se conoce comúnmente en México como “hierba del sapo”, y es utilizada en medicina tradicional para diversos tipos de enfermedades. Su extracto etanólico ha demostrado poseer propiedades antioxidantes *in vitro* e hipolipidémicas *in vivo*, probablemente debido al contenido de flavonoides y fenoles encontrados en el extracto. [Noriega *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2014]; además, el extracto hexánico de la planta ha demostrado poseer capacidad antioxidante *in vitro* [Peña-Montes, 2015].

En este trabajo se evaluó la capacidad hipoglucemiante e hipolipemiante en el suero, así como la capacidad antioxidante en el suero y mitocondrias de ventrículo izquierdo de corazón de ratas diabéticas, del extracto hexánico de *E. carlinae* a dos diferentes concentraciones, siendo estas 3 mg/kg y 30 mg/kg de peso corporal de los especímenes. Además, se realizó un análisis histológico del ventrículo izquierdo del corazón de dichos especímenes.

Los parámetros bioquímicos medidos en el suero fueron los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos. En la determinación de glucosa (gráfica 3) se observó una disminución significativa de la glucemia del grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal del extracto con respecto al grupo diabético sin tratamiento. Este efecto no fue observado en el grupo diabético tratado a una concentración de 3 mg/kg del extracto. Respecto a los grupos controles, no se observaron diferencias significativas, pero se observó una ligera disminución de la glucemia en el grupo tratado con la concentración más alta del extracto. Lo anterior puso en evidencia un efecto hipoglucemiante por parte del extracto, efecto que es puesto en evidencia a mayor concentración del mismo. Estudios demuestran que la hiperglucemia de larga duración, por un manejo deficiente de la glucemia en los pacientes con diabetes induce alteraciones permanentes en varios tejidos particularmente a nivel vascular, aun después de que la hiperglucemia se haya normalizado. Por el contrario, un buen control de la glucosa sanguínea sobre todo en etapas tempranas, trae consigo beneficios duraderos; incluso unos cuantos años de buen control glucémico del paciente con DM pueden traer beneficios duraderos en la salud [Luna *et al.*, 2011]. Manteniendo un buen control metabólico se puede reducir el riesgo de sufrir ECV en los pacientes con DM tipo 1 hasta en un 57% [Nathan *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2011]. Por lo anterior, la capacidad hipoglucemiante del extracto hexánico de *E. carlinae* podría adquirir gran importancia como coadyuvante en el tratamiento y control de la diabetes.

Respecto a los niveles de colesterol total medidos en el suero de los especímenes (gráfica 4), es evidente la tendencia a disminuir en los grupos controles, y a aumentar en los grupos diabéticos, pero estas tendencias no resultaron estadísticamente significativas. Esto es indicativo de que el extracto hexánico de *E. carlinae* a las concentraciones empleadas, no posee efectos sobre los niveles de colesterol en el suero de ratas diabéticas.



En cuanto a los niveles de triglicéridos (gráfica 5), no se observaron variaciones significativas en los grupos no diabéticos, manteniéndose dentro de los parámetros de referencia. El grupo diabético sin tratamiento reflejó un aumento importante en los niveles de triglicéridos, aumento que es característico en la enfermedad. Ambos grupos diabéticos tratados con el extracto, tanto a 30 mg/kg, como a 3 mg/kg de peso corporal, mostraron una disminución significativa de los niveles de triglicéridos con respecto al grupo diabético sin tratamiento. Dicha disminución exhibe un efecto hipolipemiente por parte del extracto. Como se mencionó anteriormente, un buen control metabólico puede reducir el riesgo de sufrir ECV en los pacientes con DM [Nathan *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2011]; la capacidad hipolipemiente del extracto hexánico de *E. carlinae* podría contribuir al correcto control metabólico de la DM.

La capacidad antioxidante del extracto en el suero, medida a través de la determinación de los niveles de lipoperoxidación, arrojó que en los grupos sin diabetes hubo una tendencia a la disminución de estos niveles, especialmente en el grupo tratado con 30 mg/kg del extracto, sin que estas diferencias resultaran significativas. En los grupos diabéticos, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal mostró una disminución significativa de los niveles de lipoperoxidación en comparación al grupo diabético sin tratamiento (gráfica 6). Ello puso de manifiesto un efecto antioxidante del extracto hexánico de *E. carlinae* en el suero de ratas diabéticas, además de que la concentración del extracto que mostró el mayor efecto concuerda con los resultados obtenidos en la glucemia. Dado que estudios previos han demostrado que el papel de las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo es crucial para el desarrollo de la MCD, así como el hecho de que diversos agentes que contrarrestan ROS o antioxidantes pueden tener la capacidad de reducir la muerte de los cardiomiocitos y atenuar el daño al corazón diabético en modelos animales experimentales [Liang & Kobayashi, 2015], la capacidad antioxidante a nivel de suero demostrada por el extracto adquiere suma importancia, pues podría coadyuvar a la prevención o enlentecimiento de la aparición de la MCD.

La presencia y el contenido de los compuestos identificados en el extracto hexánico de las inflorescencias de *E. carlinae* (tabla 1), mayormente terpenos y sesquiterpenos, ha sido ampliamente relacionado con el poder antioxidante de diversos extractos de plantas. Al farneseno, el compuesto mayoritario del extracto, se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, actividad anticarcinógena y más recientemente efectos antioxidantes *in vitro*. El  $\beta$ -pineno, uno de los compuestos mayoritarios del extracto, en estudios previos ha mostrado poseer actividad antioxidante *in vitro*. El calameneno y sus análogos, están correlacionados con la actividad antioxidante *in vitro* [Peña-Montes.2015].

A nivel de mitocondrias del ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes, se midieron los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo mediante la determinación de óxido nítrico, lipoperoxidación, glutatión y la actividad de la enzima SOD.

La determinación del óxido nítrico se llevó a cabo de manera indirecta, según lo antes descrito. En los grupos diabéticos, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal reflejó un aumento significativo de los niveles de NO en comparación al grupo diabético sin tratamiento. En los grupos control, los grupos tratados a ambas concentraciones del extracto, mostraron una tendencia al aumento de los niveles de NO, sin que esta tendencia resultara estadísticamente significativa (gráfica 7). Como se mencionó anteriormente, la reducción de la biodisponibilidad del NO resulta en un mayor estrés oxidativo, y es un sello distintivo de la disfunción endotelial y un importante contribuyente en la patogénesis de la aterosclerosis. El aumento en los niveles de NO por parte del grupo diabético tratado a 30 mg/kg del extracto puede traducirse en el aumento en la biodisponibilidad del NO, lo que podría contribuir a la disminución del estrés oxidativo y es posible que presente un efecto protector endotelial.

Los valores del ensayo de lipoperoxidación mitocondrial (gráfica 8) muestran, en los grupos sanos, un aumento en los niveles de lipoperoxidación, aumento que no fue significativo. En los grupos con diabetes, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal mostró un aumento significativo de los niveles de lipoperoxidación en comparación al grupo diabético sin tratamiento. De igual manera, fue significativo el aumento de TBARS del grupo diabético tratado con 30 mg/kg del extracto respecto al grupo control tratado a la misma concentración del extracto. Lo anterior exhibe que el extracto hexánico de *E. carlinae* no posee efecto antioxidante a nivel mitocondrial. Por el contrario, los resultados reflejan un aparente efecto prooxidante a este nivel, que parece ser potenciado por la presencia de la enfermedad.

Respecto a la medición de la capacidad antioxidante mitocondrial, ésta fue realizada a través de la cuantificación de los niveles de GSH. Como se describió, el GSH es un antioxidante no enzimático que desempeña un papel excelente al proteger las células del daño oxidativo, manteniendo los niveles celulares de las formas activas de las vitaminas C y E mediante la neutralización de los radicales libres [Anatole *et al.*, 2017]. Su determinación se llevó a cabo mediante el método de Jollow *et al* (1974) antes descrito. Los resultados arrojaron un ligero aumento en los niveles de GSH en el grupo control tratado a una concentración de 3 mg/kg del extracto, así como un aumento evidente de los niveles de GSH en el grupo diabético tratado a una concentración de 30 mg/kg del extracto (gráfica 9). Los incrementos antes mencionados sugieren una mejoría en la capacidad antioxidante mitocondrial, consecuencia de la administración del extracto. Sin embargo, ninguno de estos aumentos resultó estadísticamente significativo, por lo que el extracto hexánico de

*E. carlinae* no tuvo efectos representativos en los niveles de GSH de los grupos en tratamiento.

La medición de la actividad de la enzima SOD (gráfica 10), como reflejo de la capacidad antioxidante mitocondrial reveló que, en los grupos sanos, el grupo tratado con el extracto a una concentración de 3 mg/kg de peso corporal mostró una disminución en la actividad de la enzima SOD, sin ser dicha disminución significativa. En los grupos diabéticos, no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad antioxidante de la SOD. Lo anterior es muestra de que la actividad de la enzima SOD mitocondrial no se ve afectada por la administración del extracto hexánico de *E. carlinae*.

Los resultados del análisis histológico (figuras 22 a 27) mostraron un posible efecto protector del extracto, en el tejido procedente del ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes. A nivel microscópico, se observaron células miocárdicas aumentadas de tamaño, así como aumento en el tamaño de sus núcleos e irregularidades en la membrana nuclear, esto en el grupo diabético sin tratamiento. Estas características morfológicas son evidencia de hipertrofia celular [Díez *et al.*, 2017]. Estas características hipertróficas no se observaron en las muestras de los grupos control, ni en los grupos diabéticos tratados con ambas concentraciones del extracto.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación ponen en evidencia un efecto hipoglucemiante, hipolipemiante y antioxidante a nivel de suero del extracto hexánico de *E. carlinae*. Sin embargo, a nivel mitocondrial incrementaron los niveles lipoperoxidación. Se observó un aumento en los niveles de NO, lo que podría aumentar su biodisponibilidad y tener un efecto protector endotelial. Conjuntamente, se observó un posible efecto protector a nivel histológico del ventrículo izquierdo del corazón de ratas diabéticas.



## 10. RESUMEN DE RESULTADOS

En el suero de los especímenes en tratamiento, se analizó la capacidad hipoglucemiante e hipolipemiante del extracto hexánico de *E. carlinae*, a través de la determinación los parámetros bioquímicos: colesterol, triglicéridos y glucosa, mediante métodos espectrofotométricos, y la capacidad antioxidante del extracto mediante la cuantificación de los niveles de lipoperoxidación, utilizando una modificación del método del ácido tiobarbitúrico, obteniendo los siguientes resultados:

- Capacidad hipoglucemiante, puesta en evidencia por la disminución significativa de los niveles de glucosa del grupo diabético tratado a 30 mg/kg del extracto, respecto al grupo diabético sin tratamiento.
- Capacidad hipolipemiante, mostrada por la disminución significativa de los niveles de triglicéridos en ambos grupos diabéticos en tratamiento, comparados con el grupo diabético sin tratamiento.
- Capacidad antioxidante, debida a la disminución significativa de los niveles de lipoperoxidación en el grupo diabético tratado a 30 mg/kg del extracto, respecto al grupo diabético sin tratamiento.

En las mitocondrias del ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes, se determinó la capacidad antioxidante del extracto hexánico de *E. carlinae* a través de la determinación de los niveles de NO, lipoperoxidación, glutatión y medición de la actividad de la enzima SOD, a través de diferentes técnicas *in vitro*, obteniendo los siguientes resultados:

- Aumento significativo en los niveles de NO en el grupo diabético tratado a 30 mg/kg del extracto, respecto al grupo diabético sin tratamiento.
- Aumento significativo de la lipoperoxidación mitocondrial del grupo diabético tratado a 30 mg/kg del extracto, respecto al grupo diabético sin tratamiento.
- No se vieron efectos significativos en los niveles de GSH entre los grupos.
- No se observaron efectos significativos en la actividad de la enzima SOD entre los grupos.

El análisis histológico del ventrículo izquierdo del corazón de los especímenes, reveló:

- La presencia de hipertrofia de los miocardiocitos en el grupo diabético sin tratamiento, no así en los grupos controles ni en los grupos diabéticos tratados con el extracto hexánico de *E. carlinae*.

## **11. PERSPECTIVAS**

- Elucidar el compuesto del extracto responsable de la actividad hipoglucemiante.
- Analizar el efecto del extracto en los órganos que son principalmente dañados por la diabetes.

## **12. CONCLUSIÓN**

El extracto hexánico de la inflorescencia de *E. carlinae* posee capacidad hipoglucemiante, hipolipemiante y antioxidante en el suero de ratas diabéticas, así como un posible efecto protector histológico en el ventrículo izquierdo del corazón de ratas diabéticas. El extracto no posee actividad antioxidante en mitocondrias del ventrículo izquierdo de corazón de ratas diabéticas.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar Salinas, C., Hernández Jiménez, S., Hernández Ávila, S., & Hernández Ávila, J. (2015). Acciones Para Enfrentar la Diabetes. *Academia Nacional. de Medicina*, 1-27.
- Albuquerque, U., & Nóbrega, R. (2016). Introduction to Ethnobiology. *Springer*, 143-151.
- Al-Rasheed, N., Al- Rasheed, N., Hasan, I., Al-Amin, M., Al-Ajmi, H., & Mahmoud, A. (2016). Sitagliptin attenuates cardiomyopathy by modulating the JAK/STAT signaling pathway in experimental diabetic rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 10: 2095-2107.
- Anatole Pieme, C., Tatangmo, J., Simo, G., Biapa Nya, P., Ama Moor, V., Moukette Moukette, B., . . . Sobngwi, E. (2017). Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes. *BMC Research notes*, 10:141.
- Apostolova, N., & Victor, V. (2015). Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxidants and redox signal.ing*, Vol. 22, No. 8, 687-715.
- Aragoncillo Ballesteros, P. (2009). Anatomía del corazón. España: Editorial Nerea, S.A.
- Arredondo Falagán, A., Cadet, V., Gleymis, Román Guerra, O., & Ramírez Delgado, E. (2012). Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. *MEDISAN*, 16(5):795.
- Association, A. H. (2016). *Cardiovascular Disease & Diabetes*. Obtenido de [http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/More/Diabetes/WhyDiabetesMatters/Cardiovascular%adDisease%adDiabetes\\_UCM\\_313865\\_Article.jsp#.WLB-roWcHIV](http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/More/Diabetes/WhyDiabetesMatters/Cardiovascular%adDisease%adDiabetes_UCM_313865_Article.jsp#.WLB-roWcHIV)
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. 161-172.
- Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., Kreutzenberg, S., & Fandini, G. (2011). Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Diabetes Care*, Vol. 34 S.2, 285-290.
- Benton, C., Holloway, G., Campbell, S. E., Yoshida, Y., Tandon, N., Glatz, J., . . . Bonen, A. (2008). Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle mitochondria. *J Physiol* , 1755-1766.
- Bolant Hernández, B. C., Cejalvo Lapeña, D., Gimeno Forner, L., Gimeno Forner, O., & Lloris Carsí, J. (1990). Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata Parte 2. *Research In Surgery*, 12-20.

- Buchanan, J., Mazumder, P., Hu, P., Chakrabarti, G., Roberts, M., Yun, U., . . . Abel, D. (2005). Reduced Cardiac Efficiency and Altered Substrate Metabolism Precedes the Onset of Hyperglycemia and Contractile Dysfunction in Two Mouse Models of Insulin Resistance and Obesity. *Endocrinology*, 146(12): 5341-5349.
- Buege, J., & Aust, S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 302-310.
- Butler, A., Janson, J., Bonner Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R., & Butler, P. (2003). B-Cell Deficit and Increased B-Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *DIABETES*, Vol. 52, 102- 110.
- Calviño, C., Matrínez, S., & Downie, S. (2008). The evolutionary history of Eryngium (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1129-1150.
- Campbell, S., Tandon, N., Woldegiorgis, G., Luiken, J., Glatz, J., & Bonen, A. (2004). A Novel Function for Fatty Acid Translocase (FAT)/CD36. *Journal. of Biological. Chemistry*, Vol. 279, No. 35, 36235-36241.
- Cárdenas Rodríguez, N., & Pedraza Chaverri, J. (2005). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2): 164-173.
- Castañeda, C., Ramos, Q., & Ibáñez, V. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte Médico*, Vol. 8 No. 1, 56-72.
- Celik, K., Togar, B., Türkez, H., & Taspinar, N. (2014). In vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative effects of acyclic sesquiterpene farnesene. *Turkish Journal. of Biology*, 38: 253-259.
- Ceriello, A., Genovese, S., Mannucci, E., & Gronda, E. (2016). Glucagon and heart in type 2 diabetes; new perspectives. *Cardiovascular Diabetology*, 15:123.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*, 1241- 1252.
- Chang, T.-T., & Chen, J.-W. (2016). Emerging role of chemokine CC motif ligand 4 related mechanisms in diabetes mellitus and cardiovascular disease: friends of foes? *Cardiovascular Diabetology*, 15:117.
- Chemistry, P. V. (2003). Slides VITROS GLU DT de Bioquímica. *Ortho-Clinical. Diagnostics*, 1-8.
- Chemistry, P. V. (2005). Slide VITROS TRIG DT de Bioquímica. *Ortho-Clinical. Diagnostics*, 1-10.

- Chemistry, P. V. (2005). Slides VITROS CHOL DT de Bioquímica. *Ortho-Clinical Diagnostics*, 1-10.
- Chihuailaf, R., Contreras, P., & Wittwer, F. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, Vol. 33 No. 3, 266-281.
- Codinach Huix, P., & Freixa Pamias, R. (2002). Miocardiopatía diabética: concepto, función cardíaca y patogenia. *Anal.es de Medicina Interna*, Vol. 19 No. 6, 313-320.
- cols-, P. y. (1995). Métodos histotecnológicos. En I. d. América.
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates.
- Da Silva, M., Natali, A., Da Silva, E., Gomes, G., Teodoro, B., Cunha, D., . . . Alberici, L. (2015). Attenuation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunctions in diabetic rat heart: insulin therapy or aerobic exercise? *Journal. of the American Physiological. Society*, 119: 148-156.
- De Vriese, A., Verbeuren, T., Van de Voorde, J., Lameire, N., & Vanhoutte, P. (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal. of Pharmacology*, 963-974.
- Desrois, M., Sidell, R., Gauguier, D., King, L., Radda, G., & Clarke, K. (2004). Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular Research*, 61: 288-296.
- Díez, J., López, B., González, A., Ardanaz, N., & Fortuño, M. (2001). Respuestas del miocardio al estrés biomecánico. *Rev Esp Cardiol*, 54: 507-515.
- Diseases, N. I. (2016). *Diabetes, Heart Disease, and Stroke*. Obtenido de <http://www.niddk.nih.gov/health%ADinformation/health%ADtopics/Diabetes/diabetes%ADheart%ADdisease%ADstroke/Pages/index.aspx>
- Escobar Jiménez, F., & Tébar Massó, F. (2009). *La diabetes mellitus en la práctica clínica*. Buenos Aires: Madrid: Médica Panamericana.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon Rudolf, V., & Reiner, E. (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal.ytical. Biochemistry*, 312: 224-227.
- Ferreira Braga, J., Guimaraes Filho, F., Padovani, C., & Matsubara, B. (2005). Diastolic Dysfunction in Diabetic Normotensive Patients, Regardless of the Presence of Microangiopathy. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, Vol. 84, No. 6, 1-5.

- Gao, X., Yuan, X., Xu, B., Liu, Y., Cai, J., Liu, H.-m., . . . Xia, Z. (2012). Allopurinol attenuates left ventricular dysfunction in rats with early stages of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28: 409-417.
- García Bacallao, L., García Gómez, L., Rojo Domínguez, D., & Sánchez García, E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 20 (3): 231-5.
- García Ruiz, I. (2013). Contribución al Conocimiento del Género *Eryngium* (Apiaceae) en el Estado de Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*, 103: 65-118.
- Gastaldi, B., Assef, Y., Van Baren, C., Di Leo Lira, P., Retta, D., Bandoni, A., & González, B. (2016). Actividad antioxidante en infusiones, tinturas y aceites esenciales de especies nativas de la Patagonia Argentina. *Revista Cubana de Plantas Medicinal.es*, 21(1):51-62.
- Green, L., Wagner, D. G., Skipper, P., Wishnok, J., & Tannenbaum, S. (1982). Analysis of nitrate, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal.. Biochem*, 126: 131-138.
- Gutiérrez Perez, A., Cortés Rojo, C., Noriega Cisneros, R., Calderón Cortés, E., Manzo Ávalos, S., Clemente-Guerrero, M., . . . Saavedra Molina, A. (2011). Protective effects of resveratrol on calcium-induced oxidative stress in rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 43: 101-107.
- Guzmán Grenfell, A., Vleázquez González, A., & Sierra Vargas, M. (2006). Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, Vol 14, No. 4, 227-232.
- Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American Journal. of Medicine*, 3C: 14S-22S.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, Vol. 141, 312-322.
- Hansford, R. G. (1978). Lipid Oxidation by Heart Mitochondria from Young Adult and Senescent Rats. *Biochem. J.* , 170, 285-295.
- Hao, P., Yang, J., Liu, Y., Zhang, M., Zhang, K., Gao, F., . . . Zhang, Y. (2015). Combination of angiotensin-(1-7) with perindopril is better than single therapy in ameliorating diabetic cardiomyopathy. *Scientific Reports*, 1-12.
- Hasselbaink, D., Glatz, J., Luiken, J., Roemen, T., & Van der Vusse, G. (2003). Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochemistry*, 371: 753-760.

- Hauton, D., Bennet, M., & Evans, R. (2001). Utilisation of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochimica et Biophysica Acta*, 99-109.
- Henn, M., Janjua, B., Kanter, E., Makepeace, C., Schuessler, R., Nichols, C., & Lawton, J. (2015). Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Kir Subunits Implicated in Cardioprotection by Diazoxide. *Journal. of the American Heart Association*, 10.1161.
- Hernández Ávila, M., Gutiérrez, J., & Reynoso Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Sal.ud Pública México*, 55 supl 2:S129-S136.
- Hoang, K., Zhao, Y., Gardin, J., Carnethon, M., Mukamal, K., Yanez, D., & Wong, N. (2015). LV Mass as a Predictor of CVD Events in Older Adults With and Without Metabolic Syndrome and Diabetes. *JACC: Cardiovascular Imaging*, Vol. 8 No.9, 1007-15.
- Hou, J., Zheng, D., Zhong, G., & Hu, Y. (2013). Mangiferin mitigates diabetic cardiomyopathy in streptozocin-diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 91: 759-763.
- Institute, T. H. (2016). *Anatomía del corazón*. Obtenido de [http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy\\_Esp/anato\\_sp.cfm](http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy_Esp/anato_sp.cfm)
- Jollow, D., Mitchell, J. R., Zampaglione, N., & Gillete, J. (1974). Bromobenzene-induced liver necrosis, protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology*, 11; 151-169.
- Kelley, D., He, J., Menshikova, E., & Ritov, V. (2002). Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *DIABETES*, Vol.51, 2944-2950.
- Kim, D. H., Kim, Y. J., Sung A, C., Lee, H. W., Kim, H. N., Kim, H. K., . . . Park, Y. B. (2010). The protective effect of thalidomide on left ventricular function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *European Journal. of Heart Failure*, 12, 1051-1060.
- Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dyballa Rukes, N., McNamara, C., & Altschmied, J. (2016). Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vasculas physiology and pathology. *Antioxidants and Redox Signal.ing*, 1-59.
- Küpeli, E., Kartal, M., Aslan, S., & Yesilada, E. (2006). Comparative evaluation of the anti.inflammatory and antinociceptive activity of Turkish Eryngium species. *Journal. of Ethnopharmacology*, 107: 32-37.

- Labudda, M. (2013). Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. *University of Life Sciences- SGGW, Nowoursynowska*, 159, 02-776.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Trubidimetric Methdos for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology*, 447-454.
- Levitt Katz, L., Gidding, S., Bacha, F., Hirst, K., McKay, S., Pyle, L., & Lima, J. (2015). Alterations in left ventricular, left atrial, and right ventricular structure and function to cardiovascular risk factors in adolescents with type 2 diabetes participating in the TODAY clinical trial. *Pediatr Diabetes*, 16(1): 39-47.
- Liang, Q., & Kobayashi, S. (2015). Mitochondrial quality control in the diabetic heart. *Journal. of Molecular and Cellular Cardiology*, 1-13.
- Lletí Roselló, E., Tarazón, E., Barderas, M., Ortega, A., Otero, M., Molina Navarro, M., . . . Rivera, M. (2014). Heart Mitochondrial Proteome Study Elucidates Changes in Cardiac Energy Metabolism and Antioxidant PRDX3 in Human Dilated Cardiomyopathy. *PLOS ONE*, Vol. 9, Issue 11, e112971.
- López Luengo, M. (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante. *Fitoterapia*, Vol. 25 No. 5, 82-88.
- López, V., Akerreta, S., Caverro, R., & Calvo, M. (2007). Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*, 7 (1): 43-47.
- Luiken, J., Arumugam, Y., Bell, R., Calles-Escandon, J., Tandon, N., Glatz, J., & Bonen, A. (2002). Changes in fatty acid transport and transporters are related to the severity of insulin deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E612-E621.
- Luna, P., Pastelín, G., & Martínez, M. (2011). La diabetes mellitus y la cardioprotección. *Revista Mexicana de Anestesiología*, Vol. 34 No. 2 111-125.
- McGarry, D. (2002). Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes. *Diabetes*, Vol. 51, 7-18.
- Miranda, R., Castro, P., Verdejo, H., Chiong, M., Diaz Araya, G., Mellado, R., . . . Lavandero, S. (2007). Estrés oxidativo e inflamación en insuficiencia cardiaca: Mecanismos de daño y alternativas terapéuticas. *Rev Med Chile*, 135: 1056-1063.
- Moreno Sánchez, R., & Hansford, R. (1988). Dependence of cardiac mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity on intramitochondrial free Ca<sup>2+</sup> concentration. *Biochem. J.* , 256, 403-412.



- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., & Weil, A. (2010). *Harper. Bioquímica ilustrada*. China: Mc Graw Hill.
- Nathan, D., Cleary, P., Backlund, J.-Y., Genuth, S., Lachin, J., Orchard, T., . . . Zinman, B. (2005). Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 353 No. 25, 2643-53.
- National Heart, L. a. (s.f.). *Whats Causes Diabetic Heart Disease?* Obtenido de <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health%ADtopics/topics/dhd/causes>
- Navarrete Mora, T., Delgado Sandoval, S., Padilla Raygoza, N., Sumaya Martínez, M., Calixto Olalde, G. R., & García López, M. (2016). Propiedades hipoglucemiantes de la especie Justicia spicigera Schlechtendal (Scrophulariales: Acanthaceae). *Métodos en Ecología y Sistemática*, Vol. 11(1):25.
- Nelson, D., & Cox, M. (2009). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. España: Ediciones Omega.
- Noriega Cisneros, R., Ortiz Ávila, O., Esquivel Gutiérrez, E., Clemente Guerrero, M., Manzo Avalos, S., Salgado Garciglia, R., . . . Saavedra Molina, A. (2012). Hypolipidemic Activity of Eryngium carlinae on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochemistry Research International*, 1-5.
- Omodanisi, E. I., Aboua, Y. G., & Oguntibeju, O. O. (2017). Assesment of the Anti-Hyperhlycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of Moringa Oleifera in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. *Molecules*, 22,439.
- Organization, W. H. (2016). Informe Mundial sobre la Diabetes. *Organización Mundial. de la Sal.ud*.
- Palomer, X., Barroso, E., & Vázquez Carrera, M. (2015). Inflammation and metabolic dysregulation in diabetic cardiomyopathy. *Recent Advances in Pharmaceutical. Sciences*, 167-186.
- Peña Montes, D. J. (2015). Análisis de la actividad antioxidante del extracto hexánico de la inflorescencia de Eryngium carlinae, " in vitro" y en Saccharomyces cerevisiae como modelo de sistema biológico. *Tesis*.
- Peña Montes, D. J., & Ramírez Uribe, A. J. (2016). Reporte técnico. *Laboratorio de bioquímica*.
- Perez Gutierrez, R., & Vargas Solis, R. (2006). Y-Lactone isolated froma methanol extract of the leaves of Eryngium carlinae and their antispasmodic effect on rat ileum. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinal.es y Aromáticas*, Vol. 5, No. 3, 51-56.

- Program, N. D. (2007). The Link Between Diabetes and Cardiovascular Disease.
- Pública, I. N. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. *ENSANUT MC 2016*, 1-145.
- Ramos, L., Schmitt Cavalheiro, C., & Gomes Cavalheiro, É. (2006). Determinacao de nitrito em aguas utilizando extrato de flores. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 5, 1114-1120.
- Romero Silva, J., Suárez, C., Giordano, H., & Puigbó, J. (2006). Repercusión cardiovascular de la diabetes mellitus de tipo II: estudio postmortem. *Gaceta Médica de Caracas*, Vol. 114, No. 2.
- Saavedra Molina, A., Salgado Garciglia, R., Noriega Cisneros, R., Esquivel Gutiérrez, E., Manzo Avalos, S., Cortés Rojo, C., & Montoya Pérez, R. (2014). Oxidative stress in diabetes and hipertension treated with alternative therapy of medicinal plants. En *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Protein Oxidation* (pág. 285). 1st ed Angel Catalá.
- Sacks, D., Arnold, M., Bakris, G., Bruns, D., Horvath, A., Kirkman, S., . . . Nathan, D. (2011). Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 99.
- Salud, S. d. (23 de 11 de 2012). *NORMA Oficial. Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus*. Obtenido de Diario Oficial de la Federación: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010)
- Seino, Y., Nanjo, K., Tajima, N., Kadowaki, T., Kashiwagi, A., Araki, E., . . . Ueki, K. (2010). Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *Journal. of Diabetes Investigation* , Vol. 1 Issue 5, 212-228.
- Sen, S., Chen, S., Wu, Y., Feng, B., Lui, E., & Chakrabarti, S. (2012). Preventive effects of North American Ginseng (*Panax quinquefolius*) on Diabetic Retinopathy and Cardiomyopathy. *Phytotherapy research*, 10.1002/4719.
- Shang, Y., Zhang, X., Chen, L., Leng, W., Lei, X., Yang, Q., . . . Wang, J. (2016). Assesment of Left Ventricular Structurak Remodelling in Patients with Diabetic Cardiomyopathy by Cardiovascular Magnetic Resonance. *Journal. of Diabetes Research*, 1-8.
- Sigma-Aldrich. (2014). 19160 SOD determination kit. USA.
- Sim Choo, W., & Khing Yong, W. (2011). Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. *Advances in Applied Science Research*, 2 (3): 418-425.

- Singh, A., Wirtz, M., Parker, N., Hogan, M., Strahler, J., Michailidis, G., . . . Friedman, J. (2009). Leptin-mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *PNAS*, Vol. 106, No. 31, 13100-13105.
- Sverdlov, A., Elezaby, A., Qin, F., Behring, J., Luptak, I., Calamaras, T., . . . Colucci, W. (2016). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Cardiac Structural, Functional, and Mitochondrial Consequences of Diet-Induced Metabolic Heart Disease. *Journal of American Heart Association*, 115.002555.
- Taegtmeyer, H., Golfman, L., Sharma, S., Razegui, P., & Van Arsdall, M. (2004). Linking Gene Expression to Function: Metabolic Flexibility in the Normal and Diseased Heart. *New York Academy of Sciences*, 202-213.
- Tayyab Akhtar, M., Mohd Sarib, M., Safinar Ismail, I., Abas, F., Isamil, A., Lajis, N., & Shaari, K. (2016). Anti-Diabetic Activity and Metabolic Changes Induced by *Andrographis paniculata* Plant Extract in Obese Diabetic Rats. *Molecules*, 3-18.
- Thierer, J. (2006). Insuficiencia cardiaca y diabetes. *Rev Argent Cardiol*, 74: 60-67.
- Torres Herrera, F. (2012). La diabetes y el corazón. *Revista Cubana de Endocrinología*, 23(2): 113-116.
- Towner, R., Smith, N., Saunders, Carrizales, J., Lupu, F., Silasi Mansat, R., . . . Mason, R. (2015). In Vivo Targeted Molecular Magnetic Resonance Imaging of Free Radicals in Diabetic Cardiomyopathy within Mice. *Free Radic Res*, 49(9): 1140-1146.
- Vallejo, S., Palacios, E., Romacho, T., Villalobos, L., Peir, C., & Snchez-Ferrer, C. (2014). The interleukin-1 receptor antagonist anakira improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*, 13:158.
- Venereo Gutiérrez, J. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2):126-33.
- Villarreal Ibarra, E., Lagunes Espinoza, L., López, P., García López, E., Palma López, D., Ortiz García, C., & Oranday Cárdenas, M. (2015). Evaluación etnofarmacológica de plantas con propiedades hipoglucémicas usadas en la medicina tradicional del sureste de México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinal.es y Aromáticas*, 14 (2): 99-112.
- Wang, S., Ding, L., Ji, H., Xu, Z., Liu, Q., & Zheng, Y. (2016). The Role of p38 MAPK in the Development of Diabetic Cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1037.

- Xu, Z., Wang, S., Ji, H., Zhang, Z., Chen, J., Tan, Y., . . . Cai, L. (2016). Broccoli sprout extract prevents diabetic cardiomyopathy via Nrf2 activation in db/dbT2DM mice. *Scientific reports*, 1-12.
- Yüksel Kalkan, G., Gür, M., Elbasan, Z., Oytun Baykan, A., Kuloglu, O., Yildiray Sahin, D., . . . Cayli, M. (2014). Left ventricle geometry affects coronary flow reserve in diabetic patients. *Türk Kardiyol Dern Ars*, 50-57.