



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**  
**Instituto de Investigaciones Químico Biológicas**



---

---

**Maestría en Ciencias en Biología Experimental**

**Laboratorio de Bioquímica**

**TESIS**

**“Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* en riñones de ratas con diabetes experimental”**

Que para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en Biología Experimental**

Presenta:

**Q.F.B. Cinthia Itzel Landa Moreno**

**Director de Tesis:**

**D.C. Salvador Manzo Avalos**

**Co-Director de Tesis:**

**D.C. Alfredo Saavedra Molina**

**Noviembre 2021, Morelia, Michoacán.**

**La presente investigación se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el Laboratorio de Bioquímica, bajo la dirección y asesoría del D.C. Salvador Manzo Avalos y el D.C. Alfredo Saavedra Molina.**



## DEDICATORIA

A **Dios** por permitirme culminar con éxito mi tan anhelada meta, por haberme brindado la salud y la fortaleza en todo momento.

A mis padres, **Rosa e Ismael**, que siempre han estado para mí incondicionalmente, sin ustedes esto no hubiera sido posible. Gracias por ser el mejor ejemplo a seguir. Mis logros siempre serán de ustedes. Los quiero mucho.

A la memoria de mis abuelitos, **Raquel y Cuauhtémoc**, quienes fueron mis segundos padres. Aunque hoy ya no pueda tenerlos presentes aquí conmigo celebrando mis logros, que también son de ustedes, y poderlos abrazar físicamente, los abrazo con toda mi alma y les dedico todas y cada una de las palabras escritas en esta tesis. Espero que desde donde estén, se sientan orgullosos de mí como yo siempre lo estaré de ustedes. Los amo para siempre.

A mi **tío Temo**, quien me apoyó en todo momento y siempre tuvo fe en mí. Sé que ahora desde el cielo estas acompañándome en este logro tan importante de mi vida, como siempre lo hiciste cuando estabas aquí. Siempre estarás en mi corazón.

A mi novio **Cesar**, quien me apoyó y acompañó durante todo este proceso. Gracias por creer en mí, por siempre alentarme a alcanzar mis metas y por estar presente en todo momento.

A mis hermanas, **Demi y Scarlett**, mis compañeras de vida, que siempre están conmigo en las buenas y en las malas.

A toda mi familia, que siempre están presentes en cada momento importante de mi vida. Gracias por siempre brindarme ese respaldo incondicional.

## AGRADECIMIENTOS

*A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, y en particular, al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas** por brindarme las herramientas necesarias para mi formación académica.*

*Mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, el **Dr. Alfredo Saavedra Molina** y el **Dr. Salvador Manzo Avalos**, por haberme recibido en el laboratorio de Bioquímica y haberme brindado la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación bajo su dirección. Gracias por su amistad, su constante apoyo, sus asesorías y observaciones indispensables para el desarrollo de este trabajo, por sus valiosas enseñanzas y por sus conocimientos compartidos.*

*Al **Dr. Rafael Salgado Garciglia**, por haberme otorgado la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Biotecnología Vegetal. Por su asesoría y conocimientos compartidos.*

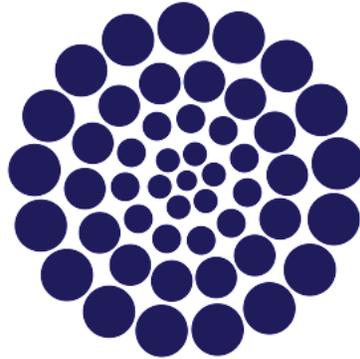
*A los profesores miembros de mi comité tutorial, el **D.C. Rafael Salgado Garciglia**, la **D.C. Rocío del Carmen Montoya Pérez** y el **D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez**, por sus valiosas aportaciones, sus conocimientos compartidos y críticas constructivas a lo largo de este proyecto.*

*Al **M.C. Donovan Javier Peña Montes**, por su apoyo incondicional en la parte experimental, por sus valiosos consejos y observaciones durante la realización de este proyecto, y en especial por su amistad.*

*A la **D.C. Maribel Huerta Cervantes**, por su amistad, sus comentarios y conocimientos compartidos.*

*A la **Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero**, por sus valiosos consejos y su apoyo recibido durante el desarrollo de este trabajo.*

*A mis queridos compañeros y amigos, la **LBT. Mitchell Trejo**, la **Biol. Daniela García** y el **Q.F.B. Jenaro Lemus**, por su constante apoyo y su grata compañía en el laboratorio, pero sobre todo muchas gracias por brindarme su valiosa amistad.*



**CONACYT**

Tesis apoyada por **CONACYT** a través de la beca **1007919**.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. RESUMEN GENERAL.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. Diabetes mellitus (DM).....	5
3.2. Manifestaciones clínicas y complicaciones crónicas de la DM.....	6
3.2.1. Complicaciones macrovasculares.....	6
3.2.1.1. Aterosclerosis.....	6
3.2.1.2. Dislipidemias.....	7
3.2.2. Complicaciones microvasculares.....	7
3.2.2.1. Nefropatía diabética.....	8
3.2.2.2. Retinopatía diabética.....	8
3.2.2.3. Neuropatía diabética.....	9
3.3. Criterios para el diagnóstico de DM.....	9
3.4. Diabetes Mellitus a nivel mundial y en México.....	9
3.5. Estrés Oxidante.....	10
3.5.1. Especies reactivas de oxígeno y radicales libres.....	10
3.5.1.1. Fuentes de ERO.....	10
3.6. Diabetes y estrés oxidante.....	12
3.6.1. Acumulación y acción de los productos finales de glicación avanzada.....	12
3.6.2. Incremento en la vía de polioles.....	13
3.6.3. Activación de la vía de las hexosaminas.....	14
3.6.4. Activación de la proteína C cinasa.....	14
3.7. Diabetes mellitus, riñón y estrés oxidante.....	14
3.8. Antioxidantes.....	15
3.8.1. Antioxidantes exógenos.....	16

3.9. Metabolitos secundarios de origen vegetal y su actividad antioxidante .....	17
3.10. Uso de plantas para el tratamiento de la DM.....	18
3.11. Antecedentes sobre el género <i>Potentilla</i> .....	20
3.12. <i>Potentilla indica</i> (Andrews) Th.Wolf .....	21
4. JUSTIFICACIÓN .....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVOS .....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
7.1. Material vegetal y obtención del extracto.....	27
7.2. Efecto del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de <i>P. indica</i> en ensayos <i>in vitro</i> .....	27
7.3. Determinación de ácidos fenólicos totales del extracto de acetato de etilo de <i>P. indica</i> .....	28
7.4. Determinación de flavonoides totales en el extracto de acetato de etilo de <i>P. indica</i> .....	29
7.5. Determinación de terpenoides totales en el extracto de acetato de etilo de <i>P. indica</i> .....	29
7.6 Efecto del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de <i>P. indica</i> en ensayos <i>in vivo</i> .....	30
8. RESULTADOS.....	37
8.1 Experimentación <i>in vitro</i> .....	37
8.2 Experimentación <i>in vivo</i> .....	39
9. DISCUSIÓN .....	51
10. RESUMEN DE RESULTADOS .....	58
11. CONCLUSIÓN.....	59
12. REFERENCIAS.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Potentilla indica</i> .....	21
Figura 2. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre la glucemia durante 60 días de tratamiento .....	40
Figura 3. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre el peso corporal durante 60 días de tratamiento .....	41
Figura 4. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre los biomarcadores séricos de función renal .....	43
Figura 5. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre la actividad de los complejos respiratorios en mitocondrias de riñón .....	45
Figura 6. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñón .....	46
Figura 7. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de riñón .....	47
Figura 8. Efecto del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> sobre la actividad de las enzimas antioxidantes .....	50
Figura 9. Mecanismo de acción propuesto del efecto antioxidante del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> en la célula renal .....	57

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ejemplo de plantas o frutos con actividad antidiabética en modelos experimentales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	18
Cuadro 2. Ejemplo de plantas con efecto nefroprotector en modelos experimentales diabéticos .....	19
Cuadro 3. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> del extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> .....	38
Cuadro 4. Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides en el extracto de acetato de etilo de <i>Potentilla indica</i> .....	39

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGE (Por sus siglas en inglés): Productos finales de glicación avanzada

ATP: Adenosín trifosfato

BUN (Por sus siglas en inglés): Nitrógeno ureico en sangre

CAT: Catalasa

CH<sub>3</sub>O<sub>2</sub>K: Acetato de potasio

C-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad

C-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad

CoQ: Coenzima Q

CoQ: Coenzima Q

CTE: Cadena de transporte de electrones

DAP: Dihidroxiacetona fosfato

DCIP: 2,6 diclorofenolindofenol

DM: Diabetes mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EM: Espectrometría de masas

EO: Estrés oxidante

ER: Especies reactivas

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERT: Enfermedad renal terminal

FMN: Flavín mononucleótido

FRAP (Por sus siglas en inglés): Potencial reductor férrico

GLUT: Transportadores de glucosa independientes de sodio

GSH-Px: Glutación peroxidasa

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

HCl: Ácido clorhídrico

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HNE: Hidroxinonenal

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>: Ferrocianuro de potasio

KCN: Cianuro de potasio

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

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LPL: Lipoproteína lipasa

MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos

MDA: Malondialdehído

MS: Metabolitos secundarios

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Carbonato de sodio

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ND: Nefropatía diabética

NO: Óxido nítrico

NOX: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

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

OH<sup>·</sup>: Radical hidroxilo

ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito

PKC: Proteína kinasa C

RL: Radicales libres

SGLT: Transportadores de glucosa dependientes de sodio

SOD: Superóxido dismutasa

STZ: Estreptozotocina

TAG: Triacilglicéridos

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

VO: Vía oral

## 1. RESUMEN

La diabetes mellitus actualmente representa un problema significativo de salud pública a nivel mundial, ya que de acuerdo a lo reportado por la Federación Internacional de Diabetes (FID), la prevalencia de diagnóstico ha incrementado en los últimos años. Ante esta situación, resulta imprescindible la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. Una alternativa es el empleo de plantas medicinales, las cuales son consideradas más inocuas y de fácil acceso para los pacientes diabéticos y pueden representar una terapia complementaria al tratamiento alopático. *Potentilla indica*, comúnmente llamada “falsa fresa” o “fresa de la India”, es una planta medicinal ampliamente utilizada en la medicina tradicional asiática para el tratamiento de diversas enfermedades incluida la diabetes, debido a la actividad biológica que exhibe el contenido de metabolitos secundarios (MS) presentes en la planta.

En la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de las hojas y los tallos de *Potentilla indica*, utilizando como modelo biológico ratas diabéticas Wistar inducidas con una dosis única de estreptozotocina. Se obtuvo un extracto crudo de acetato de etilo a partir de las hojas y los tallos de *P. indica* a través de una maceración en frío. La actividad antioxidante *in vitro* se determinó por los métodos del radical DPPH, FRAP y su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica. Se realizó un análisis fitoquímico mediante técnicas espectrofotométricas para determinar el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides presentes en el extracto. Posteriormente, se administró el extracto vía oral (VO) con una dosis de 25 mg/kg durante 60 días. Al concluir con el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y se recolectó el suero para la determinación de los niveles de glucosa, así como los marcadores de función renal: nitrógeno ureico, creatinina y ácido úrico. Posteriormente, se diseccionaron los riñones para la obtención del homogenado, en el cual se determinó la actividad de la enzima antioxidante catalasa, así mismo se llevó a cabo el aislamiento de las mitocondrias de dicho órgano en donde se evaluó la actividad de los complejos I, II, III y IV de la CTE, la producción de ERO, los niveles de peroxidación lipídica como biomarcador de daño oxidativo, así como los biomarcadores antioxidantes enzimáticos mitocondriales: la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Los resultados *in vitro* demostraron que el extracto presentó una potente actividad antioxidante a las concentraciones de 10, 25 y 35 mg/mL ( $61.8 \pm 0.3$ ,  $75.7 \pm 4.2$  y  $72.2 \pm 2.7$  % de actividad

anti-peroxidación lipídica, respectivamente;  $0.1406 \pm 0.03$  y  $0.1411 \pm 0.01$  A, valores de FRAP, respectivamente), así como un elevado contenido de flavonoides principalmente ( $4251.7 \pm 28.9$   $\mu\text{g}$  de quercetina/mL de extracto).

Los resultados *in vivo* posteriores a la administración del extracto de acetato de etilo de *P. indica*, demostraron que el extracto no presentó efecto hipoglucemiante, sin embargo, previno la pérdida repentina del peso corporal en las ratas diabéticas. Adicionalmente, redujo los niveles de BUN y creatinina sérica (30 y 50 %, respectivamente). Así mismo, normalizó la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales, disminuyó la producción de ERO (27%) y la peroxidación lipídica (47%) en las mitocondrias de riñón, además aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT (41%), SOD (38 %) y GSH-Px (34 %) bajo condiciones diabéticas. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* presenta actividad antioxidante tanto *in vitro* como en los riñones de ratas con diabetes experimental.

Palabras clave: Diabetes mellitus, riñón, mitocondria, estrés oxidante, *Potentilla indica*

## 2. ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) currently represents a public health problem at the international level since, according to the reports by the IDF, the prevalence has increased in recent years. Due to this situation, the search for new therapeutic alternatives for the treatment of the DM has been essential. One of these alternatives is the use of medicinal plants, which are considered safer and easier to access for diabetic patients and may also represent a complementary therapy to allopathic treatment. *Potentilla indica*, commonly called "false strawberry" or "Indian strawberry", is a medicinal herb widely used in traditional Asian medicine for the treatment of various diseases including diabetes, due to the biological activity exhibited by the content of secondary metabolites (MS) that it presents.

In the present study, the antioxidant activity of the ethyl acetate extract from the leaves and stems of *Potentilla indica* was evaluated, using as a biological model Wistar diabetic rats induced with a single dose of streptozotocin. A crude ethyl acetate extract was obtained from the leaves and stems of *P. indica* through a cold maceration. The *in vitro* antioxidant activity was determined by the methods of the radical DPPH, FRAP and its ability to inhibit lipid peroxidation. A phytochemical analysis was carried out using spectrophotometric techniques to determine the total content of phenolic acids, flavonoids and terpenoids present in the extract. Subsequently, the extract was administered orally at a dose of 25 mg / kg for 60 days. At the end of the treatment, the rats were sacrificed and the serum was collected for the determination of glucose levels, as well as the markers of renal function: urea nitrogen, creatinine and uric acid.

Subsequently, the kidneys were dissected to obtain the homogenate, in which the activity of the antioxidant enzyme catalase was determined, likewise the isolation of the kidney mitochondria was carried out where the activity of complex I, II, III and IV of CTE was evaluated, ROS production, lipid peroxidation levels as a biomarker of oxidative damage, as well as mitochondrial enzymatic antioxidant biomarkers: superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px).

The *in vitro* results showed that the extract presented a powerful antioxidant activity at concentrations of 10, 25 and 35 mg / mL ( $61.8 \pm 0.3$ ,  $75.7 \pm 4.2$  and  $72.2 \pm 2.7\%$  anti-lipid peroxidation activity, respectively;  $0.1406 \pm 0.03$  and  $0.1411 \pm 0.01$  A, FRAP values,

respectively), as well as a high content of flavonoids mainly ( $4251.7 \pm 28.9 \mu\text{g}$  of quercetin / mL of extract).

The *in vivo* results after the administration of the ethyl acetate extract of *P. indica*, showed that the extract did not present a hypoglycemic effect, however, it prevented the excessive loss of body weight in diabetic rats. Additionally, the treatment with the extract reduced BUN and serum creatinine levels (30 and 50%, respectively). In addition, it improved the activity of mitochondrial respiratory complexes, decreased ROS production (27%) and lipid peroxidation (47%) in kidney mitochondria, as well as increased activity of the antioxidant enzymes CAT (41%), SOD (38 %) and GSH-Px (34 %). In conclusion, the results suggest that the ethyl acetate extract of *Potentilla indica* exhibits antioxidant activity both *in vitro* and in the kidneys of rats with experimental diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, kidney, mitochondria, oxidative stress, *Potentilla indica*

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) se describe como un conjunto de trastornos metabólicos de múltiples etiologías, caracterizado por presentar hiperglucemia crónica, resultante de defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambos (ADA, 2014), lo que conduce a anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y a un aumento en el estrés oxidante (Cruz-Hernández *et al.*, 2011). La DM se clasifica principalmente como diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional (FID, 2019).

La diabetes tipo 1 o insulino dependiente, es causada por autoinmunidad y se presenta en edades tempranas debido a la destrucción paulatina de las células  $\beta$  del páncreas (ADA, 2014; OMS, 2016). La diabetes tipo 1 es la primera causa de diabetes en la infancia; sin embargo, puede ocurrir a cualquier edad (FID, 2019). La diabetes tipo 2 o no insulino dependiente, es generada como consecuencia de un defecto progresivo en la secreción de insulina, de un aumento de la resistencia periférica a la misma y de un aumento de la producción de glucosa (ADA, 2014); además, está relacionada por la interacción de factores hereditarios, genéticos, metabólicos, así como otros factores tales como sobrepeso y obesidad, mala alimentación y falta de actividad física, los cuales contribuyen a una disminución en la sensibilidad a la insulina. La diabetes gestacional es un trastorno del metabolismo de la glucosa que se desarrolla durante el embarazo y que en la mayoría de los casos se resuelve una vez finalizada esta etapa (FID, 2019).

También existen otros tipos de diabetes poco frecuentes asociados a enfermedades exocrinas del páncreas, endocrinopatías, infecciones y diabetes asociada a fármacos (Fernandez-Mejía, 2013; FID, 2019). Esta última representa una excelente herramienta para el desarrollo de una diabetes experimental en la búsqueda de comprender la patogenia de la enfermedad. Por lo que, dentro de los diferentes modelos experimentales de diabetes, se encuentra el inducido químicamente por agentes farmacológicos diabetogénicos como la estreptozotocina (STZ). La STZ es un análogo citotóxico de la glucosa, que tiende a acumularse en las células  $\beta$  del páncreas a través del transportador de glucosa 2 (GLUT2). En general, el mecanismo de acción de la STZ depende de su grupo metil-nitroso urea con actividad ADN alquilante. La transferencia de dicho grupo funcional de la STZ a la molécula de ADN conduce a la

fragmentación del ácido desoxirribonucleico, de esta forma destruye a las células beta, provocando un estado de diabetes insulino dependiente (Al-awar *et al.*, 2016).

### **3.2 Manifestaciones clínicas y complicaciones crónicas de la DM**

Entre los principales síntomas agudos que caracterizan a la DM se encuentran la cetoacidosis diabética, polidipsia, polifagia y poliuria; además, los niveles de hiperglucemia crónica pueden generar daño a diferentes tejidos tales como riñones, cerebro, ojos, vasos sanguíneos y corazón, conllevando de esta manera al desarrollo de las complicaciones crónicas (Goutos *et al.*, 2015). Las complicaciones crónicas de la DM son un conjunto de procesos patológicos causados a largo plazo por las alteraciones metabólicas características de la diabetes, y a pesar de que la etiología de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) no es la misma, ambas pueden desarrollar dichas complicaciones (Eid *et al.*, 2019; FID, 2019). Las complicaciones crónicas de la DM se clasifican en microvasculares y macrovasculares. Se denominan complicaciones microvasculares a aquellos cuadros en los que predomina la afectación de la microcirculación, es decir, vasos sanguíneos de pequeño calibre. Por el contrario, las complicaciones macrovasculares involucran alteraciones en vasos sanguíneos de mayor calibre (Eid *et al.*, 2019).

#### **3.2.1 Complicaciones macrovasculares**

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

##### **3.2.1.1 Aterosclerosis**

Es una enfermedad que afecta inicialmente a la túnica íntima de las arterias de distribución, con daño endotelial e inflamación y que se caracteriza por depósitos de lípidos y proliferación de tejido fibroso, con capacidad para la obstrucción del lumen del vaso, ya sea por crecimiento de la placa de ateroma o por ruptura y trombosis (Forbes y Cooper, 2013). Es más frecuente en los pacientes que cursan DM con factores subyacentes que contribuyen con anomalías

relacionadas en la pared del vaso, las células o factores circulantes y el flujo sanguíneo. En la pared del vaso hay un aumento de la oxidación de las lipoproteínas. Los monocitos dentro de la íntima se transforman en macrófagos y por medio de receptores "scavenger", incluyendo CD36, captan las LDL oxidadas hasta transformarse en células espumosas. Diversas citoquinas producidas por los linfocitos T amplifican la respuesta inflamatoria y ocasionan la migración y la replicación de las células de músculo liso presentes en la capa media arterial hacia la íntima, estas últimas células cambian su fenotipo y se vuelven células productoras de la matriz extracelular, contribuyendo en conjunto a la formación de placas de ateroma (Hernández-Guerra *et al.*, 2020).

La aterosclerosis es la causa subyacente a las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas, por lo que adquiere gran importancia el control de lípidos plasmáticos (Goutos *et al.*, 2015).

#### 3.2.1.2 Dislipidemias

Es la alteración de la concentración normal de lípidos en la sangre, principalmente colesterol y triacilglicéridos, aunque hay otras alteraciones que pueden ser frecuentes, como la hiperquilomicronemia o la disminución del colesterol en lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). En la dislipidemia diabética se encuentran niveles elevados de triacilglicéridos (TAG) con valores mayores de 150 mg/dL en plasma, baja concentración de colesterol en lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) con valores menores de 40 mg/dL, aumento de partículas de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y excesiva lipemia postprandial (Taskinen, 2003). Esto se debe a la alteración del metabolismo de los lípidos causado por la deficiencia de insulina que provoca un déficit de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), por lo que disminuye la hidrólisis de TAG de los quilomicrones y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), por ende, no hay liberación de éstos hacia el tejido muscular y adiposo (Maldonado *et al.*, 2012). Por lo tanto, durante condiciones diabéticas, la deficiencia de insulina y/o la resistencia a la misma, alteran la concentración de ácidos grasos plasmáticos y la composición lipídica (Eid *et al.*, 2019).

#### 3.2.2 Complicaciones microvasculares

Las complicaciones microvasculares diabéticas son causadas por la exposición prolongada a altos niveles de glucosa (Goutos *et al.*, 2015). El grado de daño a los tejidos diabéticos también está influenciado por determinantes genéticos de susceptibilidad individual y, como con la aterosclerosis, por la presencia de los factores de aceleración independientes, tales como la hipertensión y la dislipidemia (Giacco y Brownlee, 2010; Eid *et al.*, 2019). Las complicaciones microvasculares más frecuentes que se presentan en los pacientes diabéticos son la nefropatía, la retinopatía y la neuropatía periférica (FID, 2019).

#### 3.2.2.1 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) es una complicación vascular crónica exclusiva de la DM, en la que se afecta la microcirculación renal, originando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular. Clínicamente se caracteriza por un incremento en la excreción urinaria de albúmina (proteinuria), con una subsecuente disminución en la tasa de filtración glomerular, las cuales en conjunto conllevan a un deterioro progresivo de la función renal. Esta disfunción renal, coincide con cambios histopatológicos, incluyendo engrosamiento de la membrana basal glomerular, expansión mesangial, hipertrofia, fusión y pérdida de células epiteliales glomerulares (podocitos), conllevando eventualmente a una glomeruloesclerosis y fibrosis de túbulo intersticial (Eid *et al.*, 2019). La ND es la principal causa de enfermedad renal terminal (ERT) en el mundo y corresponde a la segunda causa de muerte en pacientes diabéticos (Warren *et al.*, 2019).

#### 3.2.2.2 Retinopatía diabética

Se caracteriza por una serie de lesiones en la retina y es la principal causa de ceguera entre los adultos de 20-74 años. Hay cambios en la permeabilidad vascular, microaneurismas capilares, degeneración capilar, y la formación excesiva de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis). Clínicamente, la retinopatía diabética se separa en fases de la enfermedad no proliferativas y proliferativas. En las primeras etapas, la hiperglucemia puede conducir a la muerte de pericitos intramurales y engrosamiento de la membrana basal, que contribuyen a los cambios en la integridad de los vasos sanguíneos en la retina, la alteración de la barrera hemato retiniana y la permeabilidad vascular, lo que implica la pérdida progresiva de la visión. La retinopatía diabética se desarrolla durante bastantes años y casi todos los pacientes con diabetes tipo 1 y

la mayoría de la DM tipo 2, presentan algunas lesiones en la retina después de 20 años de enfermedad (Forbes y Cooper, 2013).

### 3.2.2.3 Neuropatía diabética

Caracterizada por presentar trastornos en los nervios periféricos, siendo la más común la polineuropatía sistémica distal, conocida como neuropatía diabética. Es una complicación altamente debilitante asociada con una mayor susceptibilidad a ulceraciones e infecciones y eventualmente puede conducir a amputaciones de miembros inferiores (Eid *et al.*, 2019). Clínicamente, se caracteriza por el desarrollo de anomalías vasculares, tales como engrosamiento de la membrana basal de los capilares y la hiperplasia endotelial con disminución posterior en la tensión de oxígeno y la hipoxia. La neuropatía avanzada, debido al deterioro de las fibras nerviosas, se caracteriza por alteraciones de la sensibilidad a las vibraciones, umbrales térmicos y progresa a la pérdida de percepción sensorial (Forbes y Cooper, 2013).

## 3.3 Criterios para el diagnóstico de DM

Los criterios que establece la Federación Internacional de Diabetes (FID) para el diagnóstico de la diabetes son: 1) niveles de glucemia en ayunas  $> 126$  mg/dL (7,0 mmol/L); 2) glucemia postprandial de 2 horas  $> 200$  mg/dL (11.1mmol/L); y 3) hemoglobina glucosilada, estableciendo el punto de corte en 6.5%. La DM debe ser diagnosticada si se cumple con uno o más de los criterios previamente mencionados (ENSANUT, 2018; OMS, 2016; FID, 2019).

## 3.4 Diabetes mellitus a nivel mundial y en México

Actualmente la DM representa un problema significativo de salud pública a nivel mundial debido a que ha alcanzado niveles alarmantes en los últimos años; en el año 2019 se registró una prevalencia de diagnóstico de 463 millones de personas y se estima que esta cifra aumente a 578 millones para el año 2030, y a 700 millones para 2045. De igual forma, se reportó una mortalidad de 4.2 millones de personas por DM y sus complicaciones durante 2019, representando la cuarta causa de defunciones por enfermedades no transmisibles a nivel mundial. Además, se calcula que el gasto anual en salud a nivel mundial destinado a la diabetes será de 760 mil millones de USD y se pronostica que para los años 2030 y 2045, el gasto

alcanzará los 825 mil y 845 mil millones de USD, respectivamente, representando un elevado impacto económico para la salud (FID, 2019).

La prevalencia de diagnóstico de diabetes en México consistió en 12.8 millones de habitantes en 2019, ocupando el sexto lugar a nivel mundial por diabetes y la segunda causa de mortalidad en el país, siendo la enfermedad renal la segunda causa de muerte en pacientes con DM y la principal causa de enfermedad renal terminal (FID, 2019; Warren *et al.*, 2019).

### **3.5 Estrés oxidante**

El estrés oxidante se define como un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa (Ramos-Ibarra *et al.*, 2006).

#### **3.5.1 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres**

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas inestables altamente reactivas, que contienen oxígeno, y que poseen la capacidad de generar radicales libres sumamente tóxicos (Corrales *et al.*, 2012). Los radicales libres son átomos, iones o moléculas con un electrón desapareado en su orbital más externo, teniendo una configuración espacial inestable y, por lo tanto, una gran capacidad de reaccionar con otras macromoléculas (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), modificando su estructura y función, lo que provoca efectos citotóxicos (Díaz, 2004).

##### **3.5.1.1 Fuentes de especies reactivas de oxígeno**

Dentro de la célula hay diferentes fuentes de producción de ERO, incluyendo a la mitocondria, retículo endoplásmico (RE), peroxisomas y el citosol. En este último se incluyen los sistemas enzimáticos xantina oxidasa, lipooxigenasa, óxido nítrico sintasa y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NOX). En particular, se ha determinado que es en las mitocondrias donde se produce la mayor proporción de ERO intracelulares destacando la participación de los complejos respiratorios, incluyendo a las flavoproteínas, los centros de hierro-azufre y la ubisemiquinona, que contribuyen con aproximadamente el 80% de la generación del radical superóxido en estado basal (Coughlan *et al.*, 2016). Dentro de las mitocondrias más del 90% del oxígeno se reduce a oxígeno molecular durante la fosforilación

oxidativa, dando como resultado la generación de adenosín trifosfato (ATP). A pesar de ser un proceso altamente regulado, del 2-4% del oxígeno se reduce parcialmente a  $O_2^{\cdot-}$ , en lugar de totalmente a agua por las enzimas antioxidantes presentes en condiciones fisiológicas. En mitocondrias aisladas, el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) puede generarse principalmente en dos sitios de la cadena de transporte de electrones (CTE): 1) en la NADH deshidrogenasa (complejo I) y 2) en la interfaz entre la coenzima Q (CoQ) y la citocromo c reductasa (complejo III), representando el 80% y el 15% de la producción de ERO en la mitocondria, respectivamente (Korshunov *et al.*, 1997; Pozniakovsky *et al.*, 2005).

El complejo I funciona como sitio de ingreso para los electrones del NADH en la cadena respiratoria, oxidando al NADH a  $NAD^+$ , reduce la ubiquinona a ubiquinol y utiliza la diferencia de potencial redox para translocar protones a través de la membrana interna mitocondrial (Pride y Hirst, 2010). El  $O_2^{\cdot-}$  se produce de la interacción del  $O_2$  con el FMN reducido cuando la relación  $NADH / NAD^+$  en la matriz mitocondrial es alta, resultando en la liberación del  $O_2^{\cdot-}$  a la matriz. Además, el  $O_2^{\cdot-}$  también se produce en el complejo I mediante la transferencia inversa de electrones, el cual es un proceso que ocurre en 2 pasos involucrando (1) la coenzima Q (CoQ) reducida y (2) un cambio en la fuerza motriz de protones que impulsa a los electrones de vuelta al complejo I (Forrester *et al.*, 2018).

Por otro lado, la generación del anión superóxido en el complejo III se lleva a cabo a través del ciclo Q, el cual acopla la transferencia de electrones de la ubiquinona al citocromo c con la translocación de protones desde la matriz al espacio intermembranal mitocondrial. Se han sugerido 2 sitios en los cuales se puede generar el anión superóxido dentro del mecanismo del ciclo Q, uno de ellos es cuando la ubiquinona ( $Q_i$ ) recibe el electrón del citocromo  $b_H$  y forma la semiquinona, un estado intermedio antes de formar el ubiquinol. El otro sitio es cuando el ubiquinol ( $Q_o$ ) pierde los protones y cede los electrones al citocromo  $b_L$ , en este punto se vuelve a formar una semiquinona que puede llevar un electrón desapareado y en contacto con el oxígeno daría lugar a un radical superóxido (Macedo-Márquez, 2012).

En este contexto, con base en estudios *in vitro*, se ha planteado la hipótesis de que el exceso de producción del  $O_2^{\cdot-}$  es a través del colapso prematuro del potencial de membrana mitocondrial, de modo que la fuga de electrones va a formar  $O_2^{\cdot-}$  y posteriormente, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en lugar de la producción de ATP. Además, se ha reportado que las ERO

liberadas por la mitocondria afectan a los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos dando lugar al estrés oxidante (Forbes y Cooper, 2013). Las ERO oxidan y alteran la estructura y función de las proteínas, lípidos y el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Soriano, 2013). Algunos tejidos susceptibles al daño por las ERO son el tejido nervioso, hepático y renal (Ptilovanciv *et al.*, 2013).

### **3.6 Diabetes y estrés oxidante**

Se ha demostrado que la hiperglucemia crónica, característica de la DM, estimula la producción excesiva de ERO y una disminución en la actividad de las defensas antioxidantes en los pacientes diabéticos (Forrester *et al.*, 2018); además, las enzimas oxidantes (NADPH oxidasa, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, galactosa oxidasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa y mieloperoxidasa) y las especies reactivas que se generan durante la respiración en la mitocondria, son factores que contribuyen a la formación de peróxido del hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), radical lípido peróxido ( $ROO^{\cdot}$ ), radical óxido nítrico ( $ON^{\cdot}$ ) y el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), exacerbando el estrés oxidante (Ramos, 2006). Cabe mencionar que la generación del  $O_2^{\cdot-}$  por las mitocondrias disfuncionales en la DM, se ha postulado como el evento iniciador primario en el desarrollo de las complicaciones diabéticas.

Así mismo, bajo condiciones de hiperglucemia se incrementa el estrés oxidante a través de cinco mecanismos principales tales como: 1) la acumulación y acción de los productos finales de glicación avanzada; 2) incremento en la vía de los polioles; 3) aumento en la vía de las hexosaminas; 4) la activación de diversas isoformas de la proteína cinasa C (PKC, del inglés Protein Kinase C); y 5) la disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes de defensa (Díaz-Flores, 2004; Ramos, 2006; Hernández, 2011; Salinas, 2013).

#### **3.6.1 Acumulación y acción de los productos finales de glicación avanzada**

Estas modificaciones son causadas por la interacción de la glucosa y de otros carbohidratos como la fructosa y la glucosa-6-fosfato y/o sus derivados con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, para formar productos de glicación avanzada, conocidos como AGE (por sus siglas en inglés, Advanced Glycation End Products). Inicia con la reacción de los grupos carbonilos de

los carbohidratos con los grupos amino de las proteínas, en especial con el amino terminal y el  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina, dando origen a los productos tempranos de glicación, también llamados de Amadori o fructosamina  $\alpha$ -dicarbonilos ( $\alpha$ -oxoaldehídos) como la 3-desoxiglucosona, el metilglioxal y el glioxal que son conocidos como precursores de los AGE. Éstos son más reactivos que sus predecesores y al combinarse simultáneamente con dos grupos reactivos de las proteínas, forman puentes cruzados entre ellas muy estables, produciendo su agregación y pérdida en sus funciones biológicas (Díaz-Flores, 2004). Adicionalmente, los AGE pueden interactuar con sus propios receptores, los cuales son conocidos como RAGE. Las respuestas desencadenadas por la interacción ligando-receptor incluyen principalmente activación de la vía de las cinasas MAPK y PKC, NF- $\kappa$ B, la enzima NADPH oxidasa causando a su vez un incremento de ERO, los cuales en conjunto a nivel renal, promueven en las células mesangiales y podocitos, reacciones inflamatorias y fibrogénicas por medio de la producción aumentada de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), implicados en el desarrollo de la esclerosis glomerular (Mora-Fernandez *et al.*, 2008).

### 3.6.2 Incremento en la vía de los polioles

En condiciones de hiperglucemia la ruta alternativa de conversión de la glucosa es la vía del sorbitol, también conocida como la vía de los polioles, en la cual la glucosa es transformada por la acción secuencial de dos enzimas, la aldosa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH). La primera es la responsable de la reducción irreversible de la glucosa en sorbitol y requiere como coenzima a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Esta enzima controla la vía de los polioles y se activa al estar en contacto con altos niveles de glucosa, aumentando la concentración de sorbitol y disminuyendo la disponibilidad de NADPH. La SDH cataliza la transformación del sorbitol en fructosa con la concomitante formación de NADH, reacción reconocida como el punto crítico de la vía, con repercusión en las complicaciones diabéticas, tanto por la acumulación de los productos formados (NADH y fructosa), como por su reversibilidad (Hernández, 2011). Por lo tanto, la activación de la vía de los polioles induce la disminución de la disponibilidad del NADPH celular y el aumento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> alterando el equilibrio redox intracelular que resulta en la producción reducida de óxido nítrico y aumento del estrés oxidante (Kitada *et al.*, 2010). Esta vía ocurre

en los órganos y tejidos que no requieren insulina para la captación de glucosa y en los cuales se presentan principalmente las complicaciones crónicas en condiciones de hiperglucemia como el riñón (Díaz-Flores, 2004; Ramos, 2006).

### 3.6.3 Activación de la vía de las hexosaminas

El aumento del flujo a través de esta vía está relacionado con algunos efectos de la diabetes, contribuye en parte a la estimulación de la expresión de genes como los del TGF  $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). También participa en la inducción de la resistencia a la insulina, debido a la N-acetilglucosamina ya que disminuye la actividad de transportadores de glucosa (GLUT-4) a la membrana celular e inhibe la fosforilación y la activación para el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) (Díaz, 2004).

### 3.6.4 Activación de la proteína cinasa C

La acumulación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído tres fosfato (G3P), promueve la producción de diacilgliceroles (DAG) y la subsecuente activación de la proteína cinasa C isoforma  $\beta$  (PKC- $\beta$ ), mismos que también afectan la homeostasis vascular en las células del endotelio, la retina y los glomérulos renales durante las complicaciones diabéticas en modelos animales. Además, afecta la producción de sustancias vasoactivas, ya que deprime la producción de óxido nítrico y estimula la expresión de la endotelina-1 (ET-1), lo que conduce a la disminución del flujo sanguíneo de la retina, los nervios periféricos y el riñón, en el modelo de diabetes experimental (Díaz- Flores, 2004; Ramos, 2006; Salinas, 2013).

## 3.7 Diabetes mellitus, riñón y estrés oxidante

Los riñones son los órganos principales del sistema urinario humano. Se encargan de la excreción de las sustancias de desecho a través de la orina, regulan el equilibrio del medio interno del organismo (homeostasis), controlan el volumen de los líquidos extracelulares, la osmolaridad del plasma sanguíneo, el balance de electrolitos y el pH del medio interno: además, tiene una función endócrina secretando renina, la cual participa en la regulación de la presión arterial mediante el sistema renina-angiotensina-aldosterona, calicreína, eritropoyetina y prostaglandinas. La nefrona es la unidad funcional del riñón, la cual está constituida a su vez por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado

distal que termina en un conducto colector; es en esta unidad anatómica donde se realizan la mayor parte de las funciones renales (López-Heydeck *et al.*, 2018). Además, el riñón juega un papel esencial en la homeostasis de la glucosa mediante varios procesos que incluyen gluconeogénesis renal, filtración, reabsorción y captación de la glucosa. Estos procesos pueden verse afectados en pacientes con DM debido a que las células renales, a diferencia de las células musculares y adipocitos, no requieren insulina para la captación de glucosa, pues presentan transportadores transmembranales independientes de insulina (en el segmento S1 del túbulo proximal se localizan los transportadores SGLT2 y GLUT2, mientras que en el segmento S3 predominan los transportadores SGLT1 y GLUT1) que movilizan la glucosa al interior de la célula renal como consecuencia de un menor gradiente de concentración, una vez en el interior de la célula incrementa su metabolismo en la proporción en que se incrementa la glucosa extracelular (Alarcón-Sotelo *et al.*, 2015). En este contexto, se ha demostrado que la hiperglucemia crónica estimula la producción excesiva de ERO conllevando a las células renales, tales como células mesangiales, células endoteliales glomerulares y podocitos, a un desequilibrio metabólico y con ello a un EO, hecho que provoca la pérdida progresiva de sus funciones. Por lo anterior, se considera al EO como el evento determinante en el desarrollo progresivo de la nefropatía diabética durante la evolución de la enfermedad (Forbes *et al.*, 2008; Forrester *et al.*, 2018).

### **3.8 Antioxidantes**

Los antioxidantes juegan un papel crucial en la conservación de las funciones de la célula y disminuyen la evolución de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante al contrarrestar el efecto tóxico de las ERO (Neha *et al.*, 2019). Un antioxidante es cualquier molécula que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 1997). Los antioxidantes endógenos pueden clasificarse en enzimáticos o no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos incluyen: 1) la superóxido dismutasa, que presenta tres isoformas, citoplasmática (CuZn-SOD1), mitocondrial (Mn-SOD2) y de matriz extracelular (CuZn-SOD3), que catalizan la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); 2) la catalasa (CAT), que lleva a cabo el metabolismo citosólico del  $H_2O_2$  reduciéndolo a  $H_2O$  y  $O_2$ ; y 3) la glutatión peroxidasa (GPx), enzima que utiliza al selenio como cofactor,

que oxida el glutati3n (GSH) a glutati3n disulfuro (GSSG) y que al igual que la CAT, reduce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Asayama, 1984; Castillo, 2003; Fujita, 2009). Por otro lado, los antioxidantes end3genos no enzimáticas son: glutati3n, 3cido 3rico, 3cido lipoico, bilirrubina y melatonina (Neha *et al.*, 2019). Los antioxidantes no enzimáticos al reaccionar con un RL le ceden un electr3n y se oxidan, transformándose así en un RL d3bil no t3xico y que, en algunos casos, puede generarse a su forma primitiva por la acci3n de otros antioxidantes, tambi3n pueden disminuir la disponibilidad de metales divalentes como el Fe<sup>2+</sup>, necesarios para la formaci3n del radical hidroxilo (C3spedes *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que en condiciones de hiperglucemia, la actividad de estos sistemas antioxidantes disminuye, así como la disponibilidad del NADPH, indispensable para la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Ramos *et al.*, 2006; Salinas, 2013).

### 3.8.1 Antioxidantes ex3genos

Adem3s de los efectos protectores ejercidos por los antioxidantes end3genos, otro sistema de defensa frente al estr3s oxidante es a trav3s de la suplementaci3n con antioxidantes ex3genos derivados de los alimentos y/o plantas medicinales. Las plantas son excelentes fuentes de antioxidantes y tienen un largo historial de inocuidad (Embuscado, 2015).

Entre los compuestos presentes en las plantas con mayor actividad antioxidante se encuentran los polifenoles (taninos, flavonoides, derivados del 3cido cinámico, xantonas, cumarinas, lignanos, quinonas, rotenoides, estilbenos), terpenoides, 3cidos grasos, alcaloides, 3cido asc3rbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Bhaskar y Balakrishnan, 2009; Ebrahimzadeh *et al.*, 2009). Numerosas plantas y sus extractos han sido ampliamente estudiadas en los 3ltimos a3os, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, y se ha demostrado exitosamente su propiedad antioxidante. Esta actividad farmacol3gica permite contrarrestar el efecto nocivo propiciado por las ERO en el organismo, por lo que un suministro externo de antioxidantes puede disminuir la progresi3n de enfermedades cr3nicas relacionadas con el estr3s oxidante como la diabetes, previniendo el desarrollo de complicaciones subyacentes (Kukula-Koch *et al.*, 2016),

### **3.9 Metabolitos secundarios de origen vegetal y su actividad antioxidante**

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos químicos que no actúan en el metabolismo primario de las plantas, pero intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Sepúlveda *et al.*, 2003; Granados *et al.*, 2008). En las plantas, los MS con actividad antioxidante cumplen importantes funciones de protección y estabilización frente a las ERO, que funcionan como defensa ante diversos tipos de estrés como exceso de radiación solar, alta o bajas temperaturas, sequía y cuando son atacadas por patógenos (Tun *et al.*, 2001). Los MS de las plantas se pueden dividir en tres grupos químicamente distintos, los terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Taiz y Zeiger, 2002). Éstos pueden obtenerse a partir del consumo de extractos e infusiones de las plantas y de sus diferentes partes, tales como hojas, tallos, cortezas, raíces, flores y frutos (Edeoga, 2005; Tiwari, 2011; Bellik *et al.*, 2012), Algunos MS en particular han demostrado tener actividad antioxidante en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* (Casado *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Guillamón, 2018).

Los terpenos, grupo de MS que se sintetizan a partir de metabolitos primarios en al menos dos formas diferentes, por la vía del ácido mevalónico (citoplasma) y por la ruta del metilentitol fosfato (cloroplastos), son compuestos aromáticos que mayormente se encuentran en plantas medicinales aromáticas, que son responsables del sabor, el olor o el aroma, por lo que tienen una función muy importante para su aceptación como remedios herbales (Harman-Ware *et al.*, 2016). Este tipo de compuestos han demostrado tener actividad antioxidante, antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral y anticancerígena (Hortelano, 2009; López *et al.*, 2012).

#### **3.9.1. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Son una clase muy importante de metabolitos secundarios y en su mayoría son derivados de la fenilalanina y en menor medida de la tirosina, vía la síntesis de la ruta del ácido shiquímico y fenilpropanoides. Se han identificado más de 8,000 de estas biomoléculas, cuya estructura química consiste en un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes, incluyendo a sus derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.) (Ganesan y Xu, 2017). De

acuerdo a Bellik *et al.* (2012), los compuestos fenólicos pueden subdividirse en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos.

Los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante principalmente debido a su papel como agentes reductores, donantes de hidrógeno y por su capacidad para desactivar al singulete de oxígeno. Algunos compuestos fenólicos también tienen la propiedad de quelar iones metálicos que actúan como catalizadores en reacciones de oxidación. Moo-Huchin *et al.* (2015), cuantificaron el contenido de fenoles y flavonoides y determinaron la actividad antioxidante *in vitro* de tres frutos de Yucatán: caimito (*Chrysophyllum cainito* L.), cajuil amarillo (*Anacardium occidentale* Amarillo) y cajuil rojo (*Anacardium occidentale* Rojo), observando una relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante.

### **3.10 Uso de plantas para el tratamiento de la DM**

Las plantas medicinales han jugado un papel importante en el tratamiento de la DM a nivel mundial. En la medicina tradicional se utilizan alrededor de 800 plantas para el tratamiento de la DM (Nasri *et al.*, 2015). Las plantas medicinales o sus extractos pueden optimizar el metabolismo de la glucosa y la condición integral de los diabéticos, no sólo por sus efectos hipoglucemiantes sino también al mejorar el perfil lipídico, el estado antioxidante y la función capilar. En países como China, India y Tailandia se han producido avances significativos en la integración de la medicina tradicional en modelos de salud, debido a los efectos terapéuticos de las plantas medicinales atribuidos a sus MS (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2012). En la actualidad, se ha demostrado científicamente la actividad biológica ejercida por los MS de origen vegetal, avalando el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos contra diversas enfermedades como la diabetes. En México, se han reportado numerosos estudios acerca de plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de la DM, las cuales han presentado efectos hipoglucemiantes, hipolipidémicos y antioxidantes; algunas de estas plantas son: *Cecropia obtusifolia*, *Parmentiera aculeata*, *Salvia officinalis*, *Agarista mexicana* y *Tecoma stans*, entre otras (Esquivel-Gutiérrez *et al.*, 2012).

En investigaciones realizadas por Merina *et al.*, (2010) demostraron una relación directa entre la cantidad de flavonoides extraídos de *Plumeria rubra* y su capacidad antioxidante sobre ratas Wistar diabéticas. En el cuadro 1 se describen algunos ejemplos de plantas medicinales que

han demostrado tener actividad antidiabética, con estudios *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos experimentales, en el que también se mencionan los compuestos bioactivos responsables de esta capacidad como los compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, alcaloides y terpenos (Gushiken, 2012).

**Cuadro 1. Ejemplo de plantas o frutos con actividad antidiabética en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.**

Planta	Metabolito secundario	Actividad biológica	Referencia
<i>Bervillea sonora</i>	Saponinas	Hipolipemiente, hipoglucemiante	Rivera-Ramírez <i>et al.</i> , 2011
<i>Psittacanthus calyculatus</i>	Taninos, flavonoides, fenilpropanoides	Hipoglucemiante/ antioxidante	Ávila-Acevedo <i>et al.</i> , 2012
<i>Mentha piperita</i>	Ácido rosmarínico, flavonoides, (eriocitrina, luteolina), mentol y la mentona	Antioxidante, antiinflamatorio	Sun <i>et al.</i> , 2014
<i>Chrysophyllum cainito</i>	Compuestos fenólicos	Antioxidante	Moo-Huchin <i>et al.</i> , 2015
<i>Vitis vinifera</i>	Quercetina	Antioxidante, antiinflamatorio	Sangiovanni <i>et al.</i> , 2015
<i>Camellia sinensis</i>	Quercetina, miricetina, kaempferol	Antioxidante	Guo <i>et al.</i> , 2018

De igual forma, múltiples reportes de plantas o sus extractos con propiedades antioxidantes han demostrado tener efecto protector sobre el riñón en modelos animales diabéticos (Cuadro 2) (Noori *et al.*, 2017).

**Cuadro 2. Ejemplo de plantas con efecto nefroprotector en modelos experimentales diabéticos.**

Planta	Metabolito secundario	Actividad biológica	Referencia
<i>Psidium guajava</i>	Triterpenoides	Antioxidante, antiinflamatoria	Kuang <i>et al.</i> , 2012; Sen <i>et al.</i> , 2015.
<i>Camellia sinensis</i>	Quercetina, catequinas, epigallocatequin-3-galato	Antioxidante	Renno <i>et al.</i> , 2008
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina, curcuminoides	Antioxidante, antiinflamatoria	Tapia <i>et al.</i> , 2012
<i>Astragalus membranaceus</i>	Calicosina, calicosin-7-O-beta, D-glucósido	Antioxidante, antiinflamatorio	Li <i>et al.</i> , 2011
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosidos, panaxitriol	Antioxidante	Bolton <i>et al.</i> , 2004
<i>Cinnamomum verum</i>	Polifenoles, cinamaldehído	Antioxidante, antidiabética	Muthenna <i>et al.</i> , 2014

### 3.11 Antecedentes sobre el género *Potentilla*

Las diferentes especies del género *Potentilla* spp son plantas ampliamente utilizadas en la medicina tradicional asiática. Se ha demostrado que los extractos de diferentes especies del género presentan actividad antioxidante, hipoglucemiante, antiinflamatoria, antitumoral y antidiabética, debido principalmente a su contenido de compuestos fenólicos, taninos hidrolizables y terpenoides. Varios polifenoles han sido identificados como el ácido elágico y derivados glicosilados de flavonoles (Wang *et al.*, 2013).

En los extractos derivados de plantas de *P. fruticosa*, *P. glabra* y *P. parvifolia*, se han reportado valores de 16.87, 19.37 y 23.87 µg/mL de IC50, por el método de DPPH, indicativo de la alta actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2013). Por otro lado, Zhang *et al.* (2010) reportaron que los extractos hidroalcohólico y de acetato de etilo de los frutos de *P. discolor*, mostraron un efecto sobre la disminución de los niveles de colesterol, TAG, los niveles de MDA, de NO y

de glucosa en ratas Wistar macho, debido a la presencia de flavonoides y triterpenoides en los extractos.

Qiao *et al.* (2011) aislaron a la trans-tilirosida del extracto metanólico de *P. chinensis*. Este compuesto disminuyó los niveles de colesterol, de TAG y de glucosa, y además presentó actividad antioxidante en ratas y ratones diabéticos. Otro estudio realizado en la India por Saio *et al.* (2012), evaluó el efecto antioxidante del extracto metanólico de la raíz de *P. fulgens* en ratas diabéticas, con una administración de 250 mg/kg por vía intraperitoneal, demostrando una disminución del estrés oxidante en riñón e hígado debido al contenido de compuestos fenólicos presente en el extracto.

Extractos de *P. recta* han sido probados en modelos de inflamación aguda presentando actividad antiinflamatoria (Wang *et al.*, 2013; Paduch *et al.*, 2015; Tomovic *et al.*, 2015). En 2020, Cheng *et al.* identificaron ácidos fenólicos y flavonoides en el extracto etanólico de *P. discolor*, los cuales mostraron actividad antioxidante e inhibitoria sobre las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*.

### **3.12 *Potentilla indica* (Andrews) Th.Wolf**

*Potentilla indica* (sinonimia: *Duchesnea indica* o *Fragaria indica*) es una planta perteneciente a la familia Rosaceae, comúnmente conocida como “falsa fresa” o “fresa de la India”. Es nativa del Asia del Este, sin embargo, se encuentra ampliamente distribuida en Asia, Europa y América, es una planta herbácea perenne de 10 cm de altura, el follaje es semicaducifolio con flores amarillas y sus frutos son rojos, los cuales son ovoides o globosos de 1 a 1.5 cm de diámetro y de largo y se parecen a las fresas (Fig.1) (Xiang-Hui *et al.*, 2012; Plants DB, 2016). Se ha utilizado ampliamente en la medicina tradicional asiática, principalmente para el tratamiento de la lepra, fiebre congénita, inflamación de tejido, hematemesis, cáncer, diabetes, entre otros usos (Zhu *et al.*, 2015).



**Figura 1.** *Potentilla indica*. Foto tomada de Aportes botánicos. Lázaro Juan Novara, 2012.

En México, esta especie es introducida y mayormente se cultiva como planta de ornato. Se ha encontrado en diversos estados del país como Tamaulipas, San Luis Potosí, Michoacán, Hidalgo, Estado de México, Ciudad de México, Puebla, Veracruz, Querétaro, Tlaxcala y Chiapas (Rzedowski *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que los extractos fenólicos de esta planta inhiben significativamente la proliferación de células de cáncer de ovario SKOV-3 y de cáncer de cuello uterino (Peng *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que muestra actividad antioxidante (Kim *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Xiang-Hui *et al.*, 2012), inmunomoduladora (Ang *et al.*, 2014) y actividad antiinflamatoria (Yang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012). En el año 2009 en los frutos de *P. indica* se identificaron tres antocianinas [cianidina 3-O-rutinósido (61%), peonidina 3-O-rutinósido (34%) y petunidina 3-O-rutinósido (5%)] mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con detección de matriz de fotodiodos y espectrometría de masas (EM) (Qin *et al.*, 2009). Zhu *et al.* (2015) analizaron los compuestos fenólicos del extracto etanólico de la parte aérea (tallos y hojas) de *P. indica* por HPLC-ESI-MS / MS y ESI-IT-MS y se identificaron un total de 27 compuestos fenólicos, incluyendo elagitaninos, ácido

elágico y glucósidos de ácido elágico, ácido hidroxibenzoico, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoles como la quercetina 3-O-glucurónido y kaempferol.

En 2018 Gómez *et al.* demostraron que el extracto metanólico del fruto de *P. indica* exhibe efecto antioxidante en mitocondrias de pulmones de ratas diabéticas, debido a su contenido de compuestos fenólicos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El riñón, órgano independiente de insulina para la captación de glucosa, representa uno de los órganos blanco en el desarrollo de complicaciones dentro de la evolución de la diabetes mellitus como consecuencia de una hiperglucemia crónica y un incremento en el estrés oxidante.

El daño oxidativo puede ser neutralizado mediante agentes antioxidantes. Por lo que una alternativa terapéutica es la aplicación de la medicina tradicional a través de la utilización de extractos de plantas medicinales. Los metabolitos secundarios de mediana polaridad, como los polifenoles, presentes en las hojas y los tallos de *Potentilla indica*, presentan un gran potencial para prevenir el estrés oxidante en riñón en modelos experimentales de diabetes y con ello una posible disminución del riesgo de morbimortalidad diabética.

## **5. HIPÓTESIS**

El tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* disminuye el estrés oxidante en riñones de ratas diabéticas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antioxidante de los metabolitos secundarios obtenidos del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* en riñones de ratas con diabetes experimental.

#### 6.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antioxidante del extracto de acetato de etilo de *P. indica in vitro*.
2. Evaluar el efecto hipoglucémico del extracto de acetato de etilo de *P. indica* en suero de ratas con diabetes experimental.
3. Evaluar el efecto antioxidante del extracto de acetato de etilo de *P. indica* en mitocondrias y homogenado de riñones de ratas diabéticas.
4. Evaluar la función renal en ratas diabéticas tratadas con el extracto de acetato de etilo de *P. indica*.
5. Determinar el contenido de metabolitos secundarios presentes en el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material vegetal y obtención del extracto

Las hojas y tallos de *P. indica* se recolectaron en el invernadero del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y se dejaron secar por 7 días en ausencia de luz. El extracto de acetato de etilo de *P. indica* fue obtenido mediante la maceración en frío (4 °C) del material vegetal, previamente pulverizado, con el solvente acetato de etilo en relación 1:10 (p/v) durante 10 días en la oscuridad. Posteriormente fue filtrado y concentrado en un rotavapor al vacío a una temperatura de 58 °C, después se secó a temperatura ambiente. Finalmente se preparó a una concentración de 100 mg/mL disuelto en aceite mineral y se almacenó en la oscuridad a 4 °C, hasta su uso.

### 7.2 Efecto del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *P. indica* en ensayos *in vitro*

#### 7.2.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH·

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto fue evaluada con base en la capacidad de eliminar el radical libre 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH·) siguiendo el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Brevemente, el extracto fue mezclado con la solución de DPPH· 1 mM. Las muestras fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, la absorbencia se midió a 517 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se empleó una solución de trolox (500 µg/mL) como estándar de referencia.

#### 7.2.2 Determinación de la actividad antioxidante a través del efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica

Se siguió el método descrito por García-Cerrillo *et al.*, (2018) con algunas modificaciones. El método se basa en la capacidad del extracto para inhibir la peroxidación lipídica, biomarcador de daño oxidativo, en homogenado de yema de huevo 10% (v/v) en agua desionizada como fuente rica en ácidos grasos poliinsaturados. Brevemente, se agregó el extracto a diferentes

concentraciones a 500 µL de homogenado de yema de huevo, posteriormente se le agregó FeSO<sub>4</sub> 70 mM para optimizar la formación de malondialdehído (MDA) y se incubaron a 4 °C durante 20 min. Después, se agregaron 2 ml de solución reactiva [ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% y ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N] y se incubaron en baño María hirviendo durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se atemperó y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min. Se extrajo el sobrenadante y se determinó la absorbencia a 532 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Se empleó una solución de trolox (500 µg/mL) como estándar de referencia.

### 7.2.3 Determinación de la actividad antioxidante a través de su poder reductor

Para determinar el poder reductor del extracto, se aplicó el ensayo de potencial reductor férrico (FRAP) descrito por Maruthamuthu y Kandasamy (2016). El método se basa en la capacidad del extracto para llevar a cabo la reducción del ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) a ion ferroso (Fe<sup>2+</sup>). Se diluyeron 100 µl de extracto a diferentes concentraciones con 900 µl de agua desionizada. El extracto diluido se mezcló con 2.5 mL de buffer de fosfato (0.2M, pH 6,6) y 2.5 mL de ferricianuro de potasio [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; 1%] en un tubo de ensayo, seguido de su incubación en baño María a 50 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el tubo del baño María y se agregó 2.5 mL de ácido tricloroacético 10% y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Se tomaron 2.5 mL del sobrenadante, se diluyó con 2.5 mL de agua desionizada y finalmente se añadió 0.5 mL de cloruro férrico recién preparado (FeCl<sub>3</sub>; 0,1%). Se determinó la absorbencia a 700 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18, empleando una solución de trolox (500 µg/mL) como estándar de referencia.

### 7.3 Determinación de ácidos fenólicos totales del extracto de acetato de etilo de *P. indica*

El contenido de ácidos fenólicos totales se evaluó utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Schwarz *et al.*, 2001). Brevemente, se mezclaron 10 µL de la muestra con 750 µL de la solución de Folin-Ciocalteu, preparada 1:10 con agua desionizada estéril. La solución blanco se preparó con 10 µL de acetato de etilo más 750 µL de la solución de Folin-Ciocalteu. Las mezclas se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 5 min, para después añadir 750 µL de

carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 6%. Posteriormente, se incubaron las mezclas durante 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para finalmente obtener la absorbencia a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/ml de extracto y se obtuvieron utilizando una curva patrón de concentraciones de ácido gálico como estándar mediante la siguiente ecuación

$$[x] = \frac{\text{Absorbencia} + 0.0787}{8.6465}$$

#### 7.4 Determinación de flavonoides totales en el extracto de acetato de etilo de *P. indica*

Para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método descrito por Kim *et al.*, (2003). Brevemente se mezclaron 10 µL de la muestra con 490 µL de metanol, sometiendo la mezcla a agitación en vortex por 1 min, para posteriormente agregar 1 mL de metanol, 100 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 10% y 100 µL de acetato de potasio al 1 M. Las muestras se sometieron a agitación en vortex por 1 min y se dejaron incubar por 30 min en oscuridad. La densidad óptica se midió a 415 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). Los resultados se expresaron en µg de quercetina/ml de extracto. La cuantificación se obtuvo mediante una curva patrón que se realizó con quercetina como estándar mediante la siguiente ecuación:

$$[x] = \frac{\text{Absorbencia} + 0.0114}{0.016}$$

#### 7.5 Determinación de terpenoides totales en el extracto de acetato de etilo de *P. indica*

La cuantificación de terpenoides totales en el extracto de acetato de etilo de *P. indica* se realizó empleando el método descrito por Ghorai *et al.*, (2012), el cual consistió en mezclar 1 mL de la muestra con 2.5 mL de cloroformo, sometiendo la mezcla a agitación en vortex por 3 min.

Después, se dejó reposar durante 10 min en hielo, para posteriormente agregar 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Finalmente se incubó durante 90 min en tubos con tapa y bajo ausencia de luz. Terminando el periodo de incubación, se tomó del tubo el precipitado rojizo (presencia de terpenoides) utilizando una micropipeta, el cual se mezcló en una celda con 900  $\mu\text{L}$  de metanol y se homogeneizó para posteriormente obtener su absorbencia. La densidad óptica se midió a 538 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV) empleando metanol como solución blanco. Los resultados se reportaron como equivalentes a linalol, mediante una curva patrón que se realizó con linalol como estándar mediante la siguiente ecuación:

$$[x] = \frac{\text{Absorbencia} - 0.0408}{0.041}$$

## 7.6 Efecto del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos de *P. indica* en ensayos *in vivo*

### 7.6.1 Animales

Se emplearon ratas Wistar machos con un peso 300-400 g. Se mantuvieron a temperatura ambiente con ciclos de 12 h luz/oscuridad. Se alimentaron con dieta estándar para roedores (Nutricubos Purina) y agua *ad libitum*. Se siguió el protocolo de cuidado y manejo de animales de experimentación expedido por la Secretaria de Agricultura (NOM-062-ZOO-1999). Este proyecto también fue aprobado por el Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### 7.6.2 Inducción de diabetes experimental

La inducción de la diabetes se realizó con previo ayuno de 14 horas, mediante una sola inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 45 mg/Kg y disuelta en buffer de citrato (ácido cítrico 0.1 M, pH 4.5). Las ratas normoglucémicas fueron inyectadas con el buffer de citrato (vehículo) únicamente. Cinco días después de la administración de STZ, se determinaron los niveles de glucosa utilizando un glucómetro (Marca Accu-check) para

confirmar la diabetes. Solo las ratas que mostraron los niveles de glucosa en sangre > 300 mg/dL se consideraron para el estudio.

### 7.6.3 Diseño experimental

Dos semanas posteriores a la inyección de STZ, 35 ratas fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos (n = 8-9): control normoglucémico, control diabético, normoglucémicas + extracto, diabéticas + extracto. Todos los grupos fueron administrados diariamente vía oral durante 60 días con el vehículo (aceite mineral) para los grupos controles y con el extracto de acetato de etilo de *P. indica* (25 mg/Kg) para los grupos tratados, respectivamente.

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

Se midieron los niveles de glucosa en sangre y se registró el peso corporal después de un ayuno de 12 h, cada siete días durante el tratamiento. La glucosa se midió utilizando un glucómetro comercial (Marca Accu-Check) a través de una punción en la punta de la cola.

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

#### 7.6.5.1 Obtención del suero sanguíneo

Al finalizar los 60 días de tratamiento las ratas se mantuvieron en ayuno en un periodo de 12-14 hrs y se sacrificaron por decapitación. Se colectó la muestra sanguínea, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se separó el suero para las determinaciones bioquímicas posteriores.

#### 7.6.5.2 Determinación de los parámetros séricos

Se determinaron los niveles de glucosa y de los biomarcadores de función renal en suero: creatinina, ácido úrico y nitrógeno ureico. Los parámetros séricos se analizaron espectrofotométricamente a través de un equipo automatizado comercial (DRI-CHEM Nx500i) empleando un método enzimático y/o colorimétrico.

#### 7.6.5.3 Aislamiento de las mitocondrias de riñón

Las mitocondrias de riñón fueron aisladas siguiendo el método descrito por Saavedra-Molina y Devlin (1997) con algunas modificaciones. Al finalizar el tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, los riñones fueron disectados y se les retiró la cápsula renal, después se colocaron en medio de aislamiento 1 [Manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 2 mM y ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético (EGTA) 1 mM] a 4°C y se cortaron en fragmentos pequeños. Posteriormente, los tejidos fueron homogeneizados empleando un homogenizador de vidrio con vástago de teflón impulsado con un motor. El homogenado fue centrifugado a 2,000 rpm por 10 minutos, y después se tomó del sobrenadante 2 mL de homogenado de riñón para futuras determinaciones, el resto fue transferido a otros tubos, los cuales se centrifugaron a 7,500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue decantado y la pastilla (precipitado) fue resuspendida en medio de aislamiento 2 (Manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 Mm y albúmina sérica bovina 0.2%) y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 1 mL de medio de aislamiento 2.

#### 7.6.5.4 Determinación de la concentración de proteína

La cantidad de proteína fue determinada previamente para cada ensayo *in vivo* mediante el método de Biuret como lo describió Gornal *et al.*, (1949), utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

#### 7.6.5.5 Evaluación de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial

Para la determinación de la actividad de los complejos mitocondriales I, II, III y IV, las mitocondrias de riñón fueron sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación como lo describió Spinazzi *et al.* (2012), con la finalidad de permeabilizar la membrana externa mitocondrial a través de un choque osmótico. La actividad del complejo I (NADH: ferricianuro oxidoreductasa) se evaluó de acuerdo al método descrito por Ortiz-Avila *et al.*, (2013), con ligeras modificaciones. Se añadieron 0.1 mg de proteína a buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.4; BFK) y se mezcló con tenoiltrifluoroacetona (TTFA) 0.5 mM, 1 µg antimicina A y KCN 1 mM. Esta mezcla se incubó durante 7 min a temperatura ambiente, luego se añadió  $K_3[Fe(CN)_6]$  10 µM y después se registró la fluorescencia basal durante 1 min a longitudes

de onda de excitación/emisión 352/464 nm en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF-5301PC. Posteriormente, se agregó dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida adenina 100  $\mu$ M ( $\beta$ -NADH) y se registraron los cambios en la fluorescencia durante 1 minuto, después se agregó rotenona 10  $\mu$ M y se continuó la lectura por 2 minutos, finalmente, se añadió a la reacción  $\beta$ -NADH 100  $\mu$ M y los cambios en la fluorescencia fueron registrados por otros 2 minutos. La actividad específica se calculó utilizando una curva estándar para  $\beta$ -NADH.

La actividad de la succinato-DCIP oxidoreductasa (complejo II), se midió utilizando 0.3 mg de mitocondrias de riñón, resuspendidas en BFK las cuales se incubaron con rotenona 10  $\mu$ M, KCN 1 mM y con 1  $\mu$ g de antimicina A. Esta mezcla se incubó durante 7 min a temperatura ambiente y luego se agregó 2,6 diclorofenolindofenol (DCIP) 80  $\mu$ M y se registró la absorbancia basal durante 1 min a 600 nm. La reacción se inició mediante la adición de succinato 10 mM, y los cambios en la absorbancia se registraron durante 4 minutos en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV / Vis Lambda 18 (Cortés-Rojo et al., 2007). La actividad del complejo II se calculó empleando la ley de Beer-Lambert y utilizando el coeficiente de extinción molar de 21 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para DCIP (Cortés-Rojo et al., 2007).

La actividad del complejo II + III se determinó espectrofotométricamente. Se agregó 0.3 mg de mitocondria a BFK, seguido de su incubación con rotenona 10  $\mu$ M y KCN 1 mM durante 7 min. Luego, se agregaron 250  $\mu$ g de citocromo c oxidado y se registró la absorbancia basal durante 1 min a 550 nm. Posteriormente, se agregó succinato 10 mM y los cambios en la absorbancia se midieron durante 4 min. La actividad del complejo II+III se calculó empleando la ley de Beer-Lambert y utilizando el coeficiente de extinción molar de 19.1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para el citocromo c (Cortés-Rojo et al., 2009).

La actividad de la citocromo *c* oxidasa (complejo IV), se evaluó empleando 0.3 mg de mitocondria de riñón las cuales se incubaron durante 7 min con 10  $\mu$ g de rotenona, TTFA 0,5 mM y 1  $\mu$ g de antimicina A. Luego, se añadió 125  $\mu$ g de citocromo c reducido y se registró los cambios en la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 durante 3 min (Zentella de Piña et al., 1989). La actividad del complejo IV se calculó empleando la ley de Beer-Lambert y utilizando el coeficiente de extinción molar de 19.1 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para el citocromo c (Cortés-Rojo et al., 2009).

#### 7.6.5.6 Determinación de la producción de ERO en las mitocondrias de riñón

La producción de ERO se determinó empleando la sonda fluorogénica 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Ortiz-Avila *et al.*, 2013). 0.3 mg de proteína mitocondrial se resuspendió en buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM, pH 7.4) y se incubaron con H<sub>2</sub>DCFDA 12.5 μM durante 15 min en un baño de hielo bajo agitación (Ortiz-Avila *et al.*, 2013). Después de 1 min se registró la fluorescencia basal. Posteriormente, se agregó 5 mM de glutamato + galato y se registraron los cambios en la fluorescencia durante 20 min a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/520 nm en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RFRF-5301PC. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por mg de proteína.

#### 7.6.5.7 Determinación de los niveles de peroxidación de lípidos en las mitocondrias de riñón

Los niveles de peroxidación lipídica en mitocondrias de riñón fueron determinados por el método descrito por Buege y Aust (1978) con algunas modificaciones. Este método mide la producción de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) entre las que se encuentra el malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica propiciada por radicales libres (RL). Brevemente, las mitocondrias se lavaron tres veces con PBS frío (pH 7.4) para evitar la interferencia de azúcares solubles en el medio. Posteriormente, se suspendieron 0.3 mg de proteína mitocondrial en PBS (pH 7.4), y luego se agregó la solución reactiva que contiene 0.375% ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375%, ácido tricloroacético (TCA) al 15%, HCl 0.25 M, más BHT 0,01% para prevenir la formación de cromóforos inespecíficos. Después, se incubó durante 30 min en baño María a 90 °C. Al finalizar el tiempo de incubación, se dejó enfriar y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min. La absorbencia se midió a 532 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS, usando el coeficiente de extinción molar del MDA, 156 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### 7.6.5.8 Determinación de la actividad de la enzima catalasa en el homogenado de riñón

La enzima antioxidante catalasa (CAT) neutraliza el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) catalizando la reacción hacia la formación de agua y oxígeno. La actividad de la CAT se determinó en el homogenado de riñón, midiendo la concentración de oxígeno disuelto, empleando un oxímetro con electrodo tipo Clark, después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como lo describió Jeulin *et al.* (1989),

con ligeras modificaciones. 0.2 mg de proteína de tejido homogeneizado se resuspendió en buffer de fosfato de potasio 0.1 M, con EDTA 5 mM (pH 7.6), a 25 °C y se registró el trazo durante 1 minuto. Posteriormente, se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 mM recién preparado a la cámara y se registró la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oxígeno durante 1 minuto. Finalmente, se añadió azida de sodio 1.0 mM a la cámara. La actividad de la catalasa se calculó utilizando catalasa bovina como estándar.

#### 7.6.5.9 Determinación de la actividad de la SOD en las mitocondrias de riñón

La actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial fue determinada empleando un *kit* comercial (Sigma Aldrich, USA, 19160), el cual permite determinar la actividad de la SOD mediante un método colorimétrico, usando una sal de tetrazolio Dojindo altamente soluble en agua y WST-1 (sal monosódica (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio), el cual produce un color formazán cuando éste es reducido por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. 0.1 mg de mitocondria de riñón se resuspendió en 200 µL de buffer de ensayo, se mezcló con 20 µL de solución de trabajo (como lo indica el kit) y se incubó durante 30 min a 37 °C. Las lecturas se registraron a 450 nm empleando un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).

#### 7.6.5.10 Determinación de la actividad de la GSH-Px en las mitocondrias de riñón

La actividad de GSH-Px se determinó de acuerdo con el método descrito por Lawrence y Burk (1976) con algunas modificaciones. Se resuspendieron 0.2 mg/mL de mitocondrias de riñón en buffer de fosfato de potasio 50 mM y EDTA 5 mM y se mezclaron con NaN<sub>3</sub> 1 mM, glutatión reducido 1 mM, 0.1 mg de BSA y 100 mU/ml de glutatión reductasa y se incubaron por 5 min. Durante el minuto 4 se añadieron 100 µM de NADPH (2'-fosfato de dinucleótido de β-nicotinamida y adenina reducido) y se continuó incubando el minuto restante. La fluorescencia basal se registró durante 1 min a longitudes de onda de excitación/emisión de 352/464 nm, a continuación se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250 µM y los cambios en la fluorescencia se registraron durante 3 min a 30°C en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF5301PC.

### 7.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. La significancia de las diferencias en la media se evaluó utilizando ANOVA de una o dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Experimentación *in vitro*

#### 8.1.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH; anti-peroxidación lipídica y FRAP

Las propiedades antioxidantes del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* a diferentes concentraciones se evaluaron a través de tres métodos *in vitro* diferentes. Se utilizó al trolox como antioxidante de referencia debido a que se ha demostrado en múltiples estudios su alto potencial como antioxidante (Boulebd, 2020).

Los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* se muestran en la tabla 1. Como se puede observar, todas las concentraciones evaluadas del extracto de *P. indica* mostraron una menor capacidad para reducir al radical DPPH, que el control positivo antioxidante.

Por otro lado, al comparar la actividad anti-peroxidación lipídica del trolox, que presentó un efecto protector de  $82.1 \pm 2.6\%$ , en contraste con el extracto a 10, 25 y 35 mg/mL, se observó que las tres concentraciones mostraron una potente actividad antioxidante ( $61.8 \pm 0.3$ ,  $75.7 \pm 4.2$  y  $72.2 \pm 2.7\%$ , respectivamente), sin embargo, la concentración de 25 mg/mL exhibió una actividad antioxidante estadísticamente similar al control positivo para inhibir la peroxidación lipídica, lo cual sugiere que el extracto inhibió la iniciación y/o propagación de las reacciones de oxidación en cadena a nivel de lípidos propiciadas por los radicales libres generados en presencia del  $\text{FeSO}_4$  70 mM.

Los valores de FRAP del extracto a 25 y 35 mg /mL ( $0.1406 \pm 0.03$  y  $0.1411 \pm 0.01$ , respectivamente), fueron estadísticamente similares al control positivo ( $0.1798 \pm 0.04$ ), siendo la absorbancia directamente proporcional al poder reductor. Por lo tanto, estos resultados indican que el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* presenta actividad antioxidante *in vitro*.

**Cuadro 3. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica***

	Anti-DPPH (%)	Anti-Peroxidación lipídica (%)	FRAP (A)
<b>Trolox (control)</b>	93.7 ± 4.1 <sup>a</sup>	82.1 ± 2.6 <sup>a</sup>	0.1798 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>EPi (10 mg/mL)</b>	4.2 ± 1.03 <sup>c</sup>	61.8 ± 0.3 <sup>c</sup>	0.0342 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>EPi (25 mg/mL)</b>	23.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	75.7 ± 4.2 <sup>ab</sup>	0.1406 ± 0.03 <sup>a</sup>
<b>EPi (35 mg/mL)</b>	24.8 ± 2.04 <sup>b</sup>	72.2 ± 2.7 <sup>b</sup>	0.1411 ± 0.01 <sup>a</sup>

Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes basados en la prueba ANOVA de una vía y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . EPi: extracto de acetato de etilo de *P. indica*; A: absorbencia; DE: desviación estándar.

#### 8.1.2 Determinación del contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales en el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica*

Para dilucidar la relación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos bioactivos presentes en el extracto, se determinó el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides, utilizando como estándar al ácido gálico, a la quercetina y al linalol, respectivamente.

Como se observa en el cuadro 4, el extracto de acetato de etilo de *P. indica* presentó altas concentraciones de flavonoides y terpenoides totales (4251.7 ± 28.9 µg de quercetina/mL y 659.9 ± 65.5 µg de linalol/mL, respectivamente), no obstante, el contenido de ácidos fenólicos presentes en el extracto fue relativamente bajo (2.84 ± 0.1 µg de ácido gálico/mL de extracto).

**Cuadro 4. Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides en el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica***

Ácidos fenólicos totales ( $\mu\text{g}$ de ácido gálico/mL de extracto)	Flavonoides totales ( $\mu\text{g}$ de quercetina/mL de extracto)	Terpenoides totales ( $\mu\text{g}$ de linalol/mL de extracto)
$2.84 \pm 0.1$	$4251.7 \pm 28.9$	$659.9 \pm 65.5$

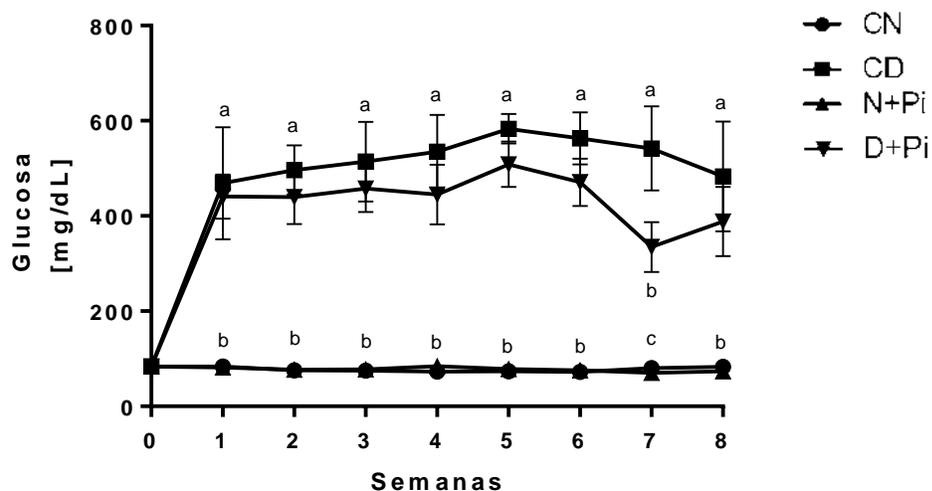
Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. DE: desviación estándar.

## 8.2 Experimentación *in vivo*

### 8.2.1 Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre los niveles de glucosa y el peso corporal

La DM se caracteriza por presentar altas concentraciones de glucosa en sangre, así como una pérdida progresiva del peso corporal. Por lo tanto, se evaluó el efecto del extracto sobre estos parámetros. Como se muestra en la figura 2, los niveles de glucemia en ayuno al finalizar el tratamiento, no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el grupo normoglucémico tratado ( $87.5 \pm 8.6$  mg/dL) con respecto al grupo control normoglucémico ( $81.9 \pm 11.1$  mg/dL), manteniendo esta tendencia a lo largo del tratamiento.

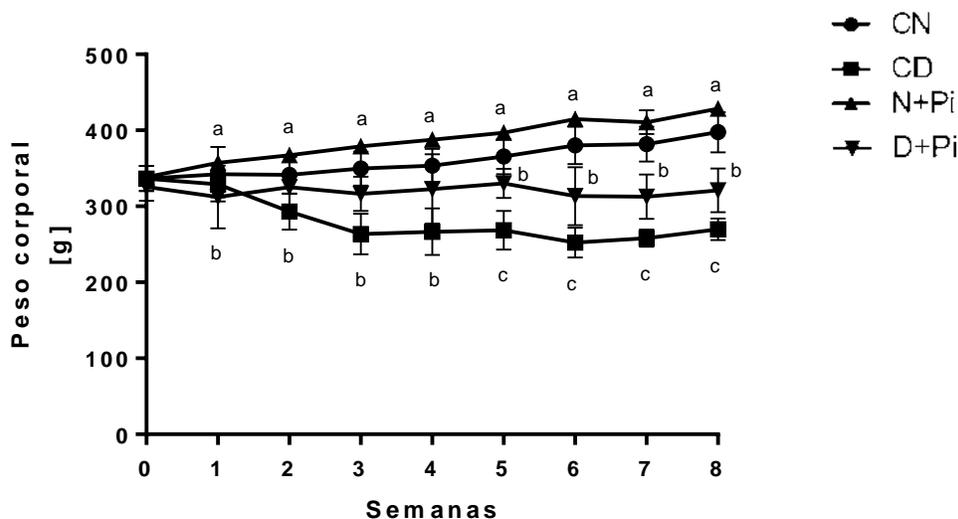
Por otro lado, el grupo diabético tratado y el grupo diabético control, mostraron niveles de glucemia superiores a los 300 mg/dL desde la primera semana de tratamiento, confirmando de esta manera el establecimiento de la diabetes experimental en el modelo biológico. Cabe destacar que los niveles de glucemia durante la semana 7 del grupo diabético tratado con el extracto de acetato de etilo de *P. indica* (25 mg/Kg) mostraron una diferencia significativa con respecto al control diabético, no obstante, al finalizar el tratamiento mostró niveles de glucemia ( $381.6 \pm 86.7$  mg/dL) significativamente mayores que el grupo control normoglucémico y estadísticamente similares a los niveles observados en el grupo control diabético ( $489.6 \pm 89.9$  mg/dL).



**Figura 2.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre los niveles de glucemia durante 60 días de tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, (n = 7-8); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . CN: control normoglicémico; CD: control diabético; N+Pi: normoglicémicas + extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* (25 mg/Kg); D+Pi: diabéticas + extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* (25 mg/Kg); DE: desviación estándar.

Durante la DM se presentan alteraciones metabólicas desencadenadas por la resistencia o secreción nula de la insulina y por ende, la incapacidad de metabolizar a la glucosa como fuente energética primaria, repercutiendo en la lipólisis del tejido adiposo y la proteólisis conllevando a una pérdida progresiva del peso corporal (American Diabetes Association, 2014). Debido a lo anterior, se evaluó el efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre el peso corporal, cuyos resultados se muestran en la figura 3. Como se puede observar en la figura 3, al finalizar las 8 semanas de tratamiento el grupo normoglicémico tratado con extracto de acetato de etilo de *P. indica* (25 mg/Kg) ( $418,6 \pm 25,5$  g) no mostró diferencias significativas en el peso corporal, en contraste con el grupo control normoglicémico ( $399.37 \pm 26.4$  g). Por otro lado, el grupo diabético tratado con el extracto de *P.indica* (25 mg / Kg) ( $315.3 \pm 32.7$  g), mostró una evidente reducción del peso corporal en comparación con el grupo control normoglicémico. No obstante, el grupo diabético tratado

con el extracto, disminuyó significativamente la pérdida excesiva de peso durante el tratamiento, en comparación con el grupo control diabético ( $271.5 \pm 27.5$  g).



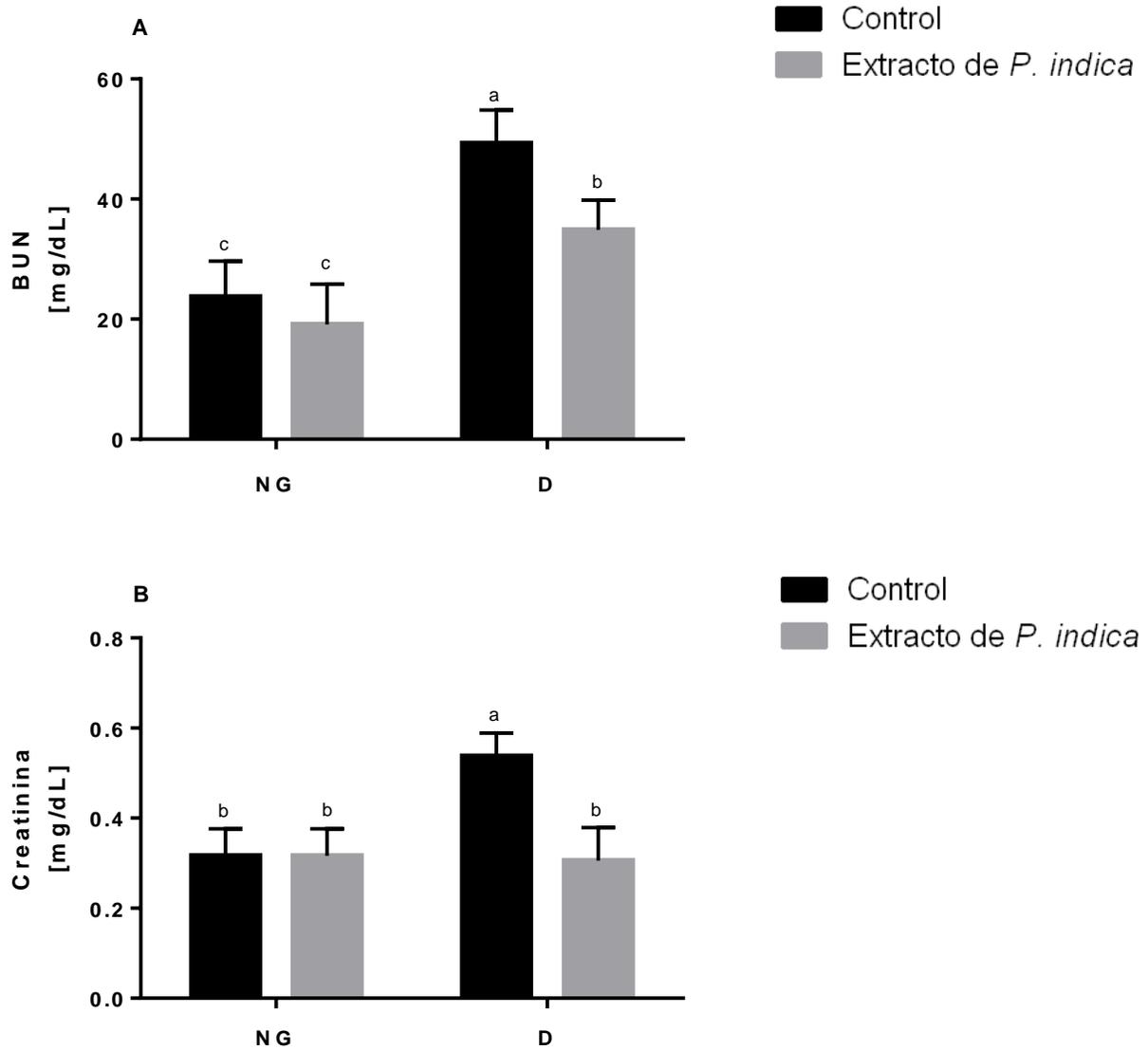
**Figura 3.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre el peso corporal durante 60 días de tratamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, (n = 7-8); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . CN: control normoglucémico; CD: control diabético; N+Pi: normoglucémicas + extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* (25 mg/Kg); D+Pi: diabéticas + extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* (25 mg/Kg); DE: desviación estándar.

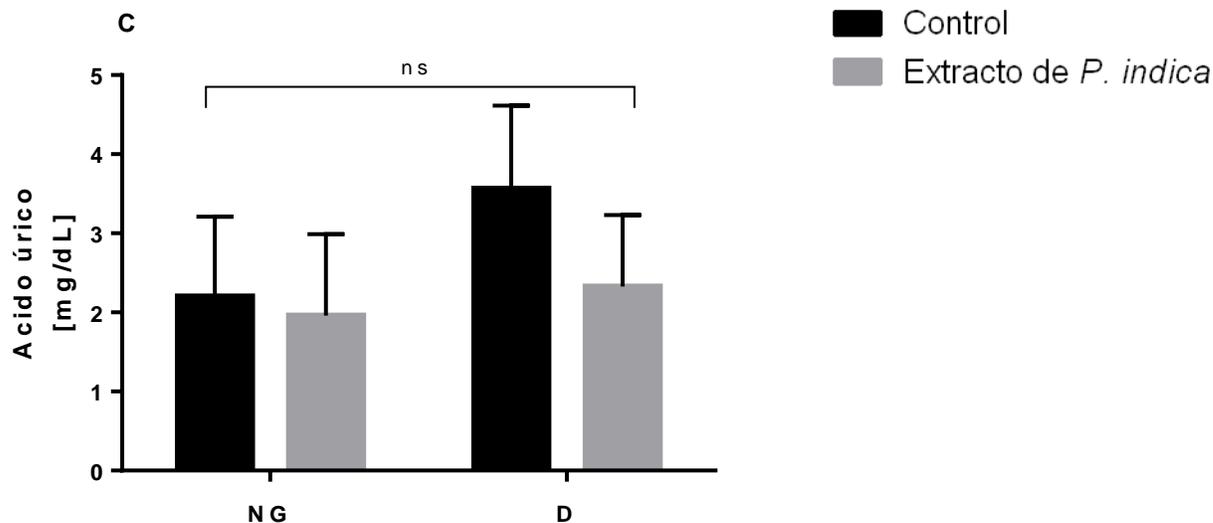
### 8.2.2 Efectos del extracto de acetato de etilo de *P. indica* sobre los parámetros séricos de función renal

Los niveles de nitrógeno ureico (BUN, por sus siglas en inglés), creatinina y ácido úrico se midieron como biomarcadores de la función renal (Figura 4 A, B y C, respectivamente).

Como se observa en la figura 4 A, B y C el grupo control diabético mostró una marcada reducción de la función renal, caracterizada por aumentos significativos en el BUN ( $49.2 \pm 5.5$  mg/dL) y los niveles de creatinina sérica ( $0.6 \pm 0,05$  mg/dL), en comparación con el grupo control normoglucémico ( $23.7 \pm 5.9$  y  $0.3 \pm 0.02$  mg/dL, respectivamente). Por otro lado, el

tratamiento con el extracto en condiciones diabéticas, redujo significativamente el BUN y la creatinina sérica ( $34.8 \pm 4.9$  y  $0.3 \pm 0,09$  mg/dL, respectivamente), en contraste con el grupo control diabético, sin embargo, la reducción del ácido úrico sérico no fue significativa.





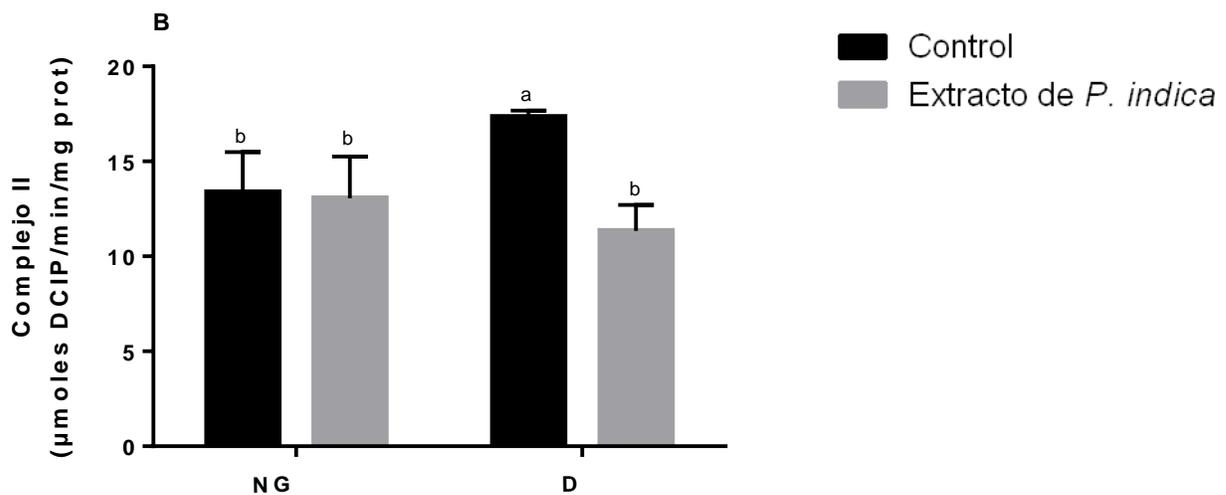
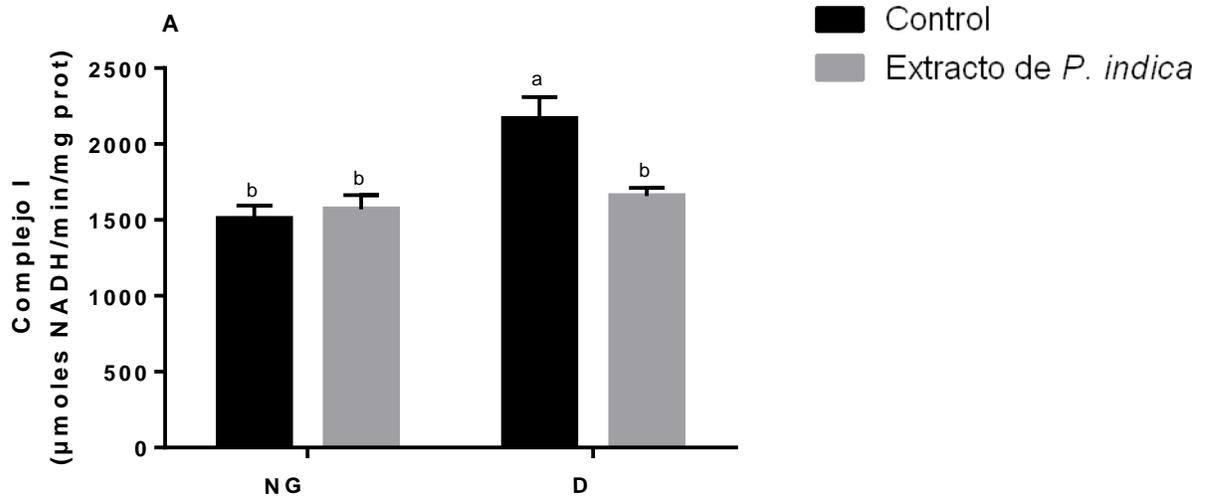
**Figura 4.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre los biomarcadores séricos de función renal. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, (n = 7-8); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . NG: normoglucémicas; D: diabéticas; DE: desviación estándar.

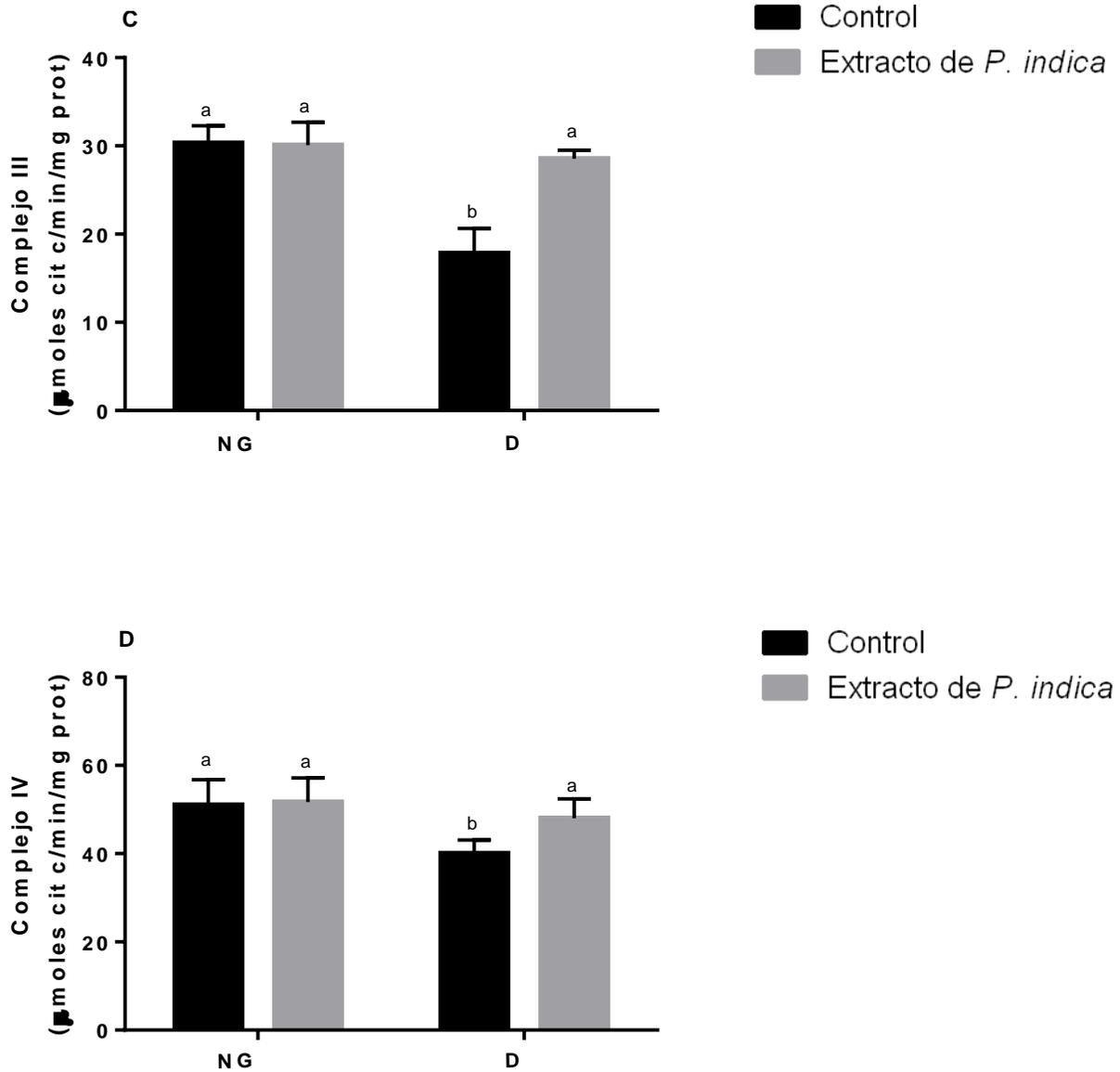
### 8.2.3 Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales

Múltiples estudios han demostrado una estrecha relación entre la disfunción mitocondrial y el desarrollo de la ND (Daenen *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, se evaluó el efecto del extracto de acetato de etilo de *P. indica* sobre la funcionalidad mitocondrial, al determinar la actividad de los complejos respiratorios en mitocondrias de riñón (Figura 5).

Como se puede observar, la actividad de los complejos I y II (Figura 5 A, B) incrementó en el grupo control diabético con respecto al grupo control normoglucémico (43.7 y 30.0%, respectivamente), mientras que el grupo diabético tratado con el extracto mostró una actividad para ambos complejos estadísticamente similar a los grupos normoglucémicos. Por el contrario, como se muestra en la figura 5C y 5D, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en las actividades de los complejos III y IV del grupo control diabético en comparación con el grupo control normoglucémico (41.2 y 21.6%, respectivamente). Por otro

lado, la actividad de los complejos III y IV del grupo diabético tratado, aumentó significativamente en comparación con el grupo control diabético (30.6 y 16.6%, respectivamente), siendo además estadísticamente similar al grupo normoglucémico (Figura 5C, 5D). Estos resultados sugieren que el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* mejora la funcionalidad mitocondrial al normalizar la actividad de los complejos respiratorios.

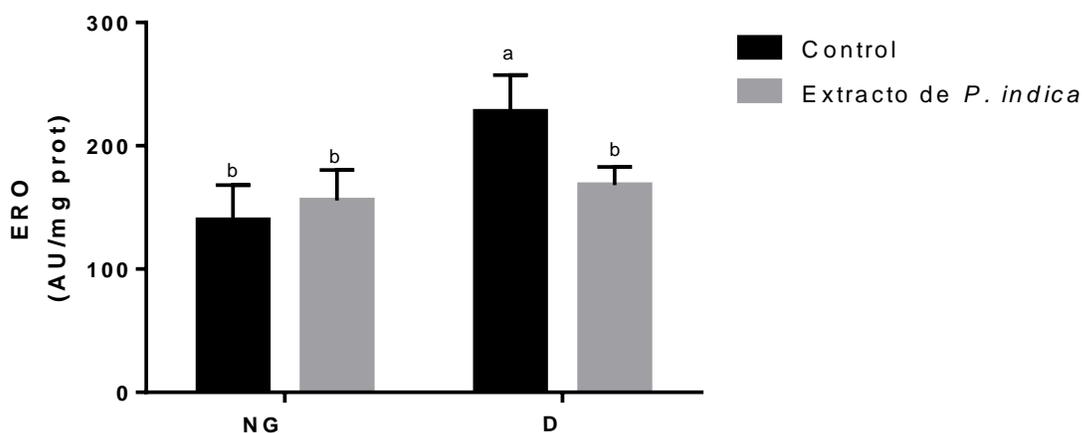




**Figura 5.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la actividad de los complejos respiratorios en mitocondrias de riñón. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, ( $n = 7-8$ ); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . NG: normoglucémicas; D: diabéticas; DE: desviación estándar.

#### 8.2.4 Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñón

Para dilucidar si el efecto protector que ejerció el extracto al mejorar la actividad de los complejos respiratorios se relacionaba con la reducción del estrés oxidante, se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñón. Como se puede observar en la figura 6, la producción de ERO por parte del grupo control diabético ( $227.6 \pm 29.8 \Delta F$ ) aumentó significativamente 63% en comparación con el grupo control normoglucémico ( $139.6 \pm 28.6 \Delta F$ ). Por otro lado, el grupo diabético tratado con el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* (25 mg/Kg) ( $168.2 \pm 14.6 \Delta F$ ) mostró una disminución significativa en la producción de ERO en comparación con el grupo control diabético y estadísticamente similar a los grupos normoglucémicos. De acuerdo a estos resultados se puede inferir que el extracto de acetato de etilo de *P. indica* está contrarrestando el estrés oxidante al disminuir la producción de ERO en las mitocondrias de riñón bajo condiciones diabéticas, resultado que además se correlaciona con la restauración de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales.

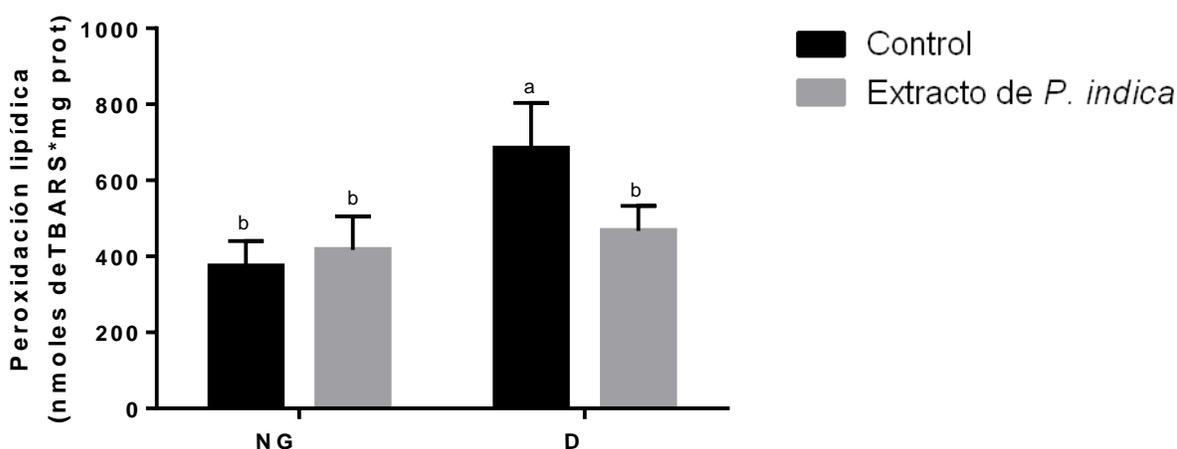


**Figura 6.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de riñón. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, (n = 7-8); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . NG: normoglucémicas; D: diabéticas; DE: desviación estándar.

### 8.2.5 Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la peroxidación lipídica en las mitocondrias de riñón

La producción excesiva de ERO inducida por la hiperglucemia crónica bajo condiciones diabéticas puede generar daño celular a través de la oxidación de las diferentes biomoléculas, incluyendo a los lípidos de la membrana mitocondrial afectando de esta manera la integridad y la función mitocondrial. Es por ello que se evaluó el efecto protector del extracto sobre el daño oxidativo propiciado por las ERO, midiendo la peroxidación lipídica en las mitocondrias de riñón mediante el método de TBARS.

Los niveles de peroxidación lipídica se muestran en la Figura 7. Como se puede observar, el grupo control diabético mostró un aumento significativo de los niveles de TBARS comparándolos con el grupo control normoglucémico. Por otro lado, en las ratas diabéticas, el tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *P. indica* disminuyó significativamente la peroxidación lipídica un  $\sim 47\%$  en comparación con el grupo control diabético, siendo además, estadísticamente similar a los niveles de peroxidación lipídica mostrados por los grupos normoglucémicos.



**Figura 7.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la peroxidación lipídica en mitocondrias de riñón. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, (n = 7-8); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . NG: normoglucémicas; D: diabéticas; DE: desviación estándar.

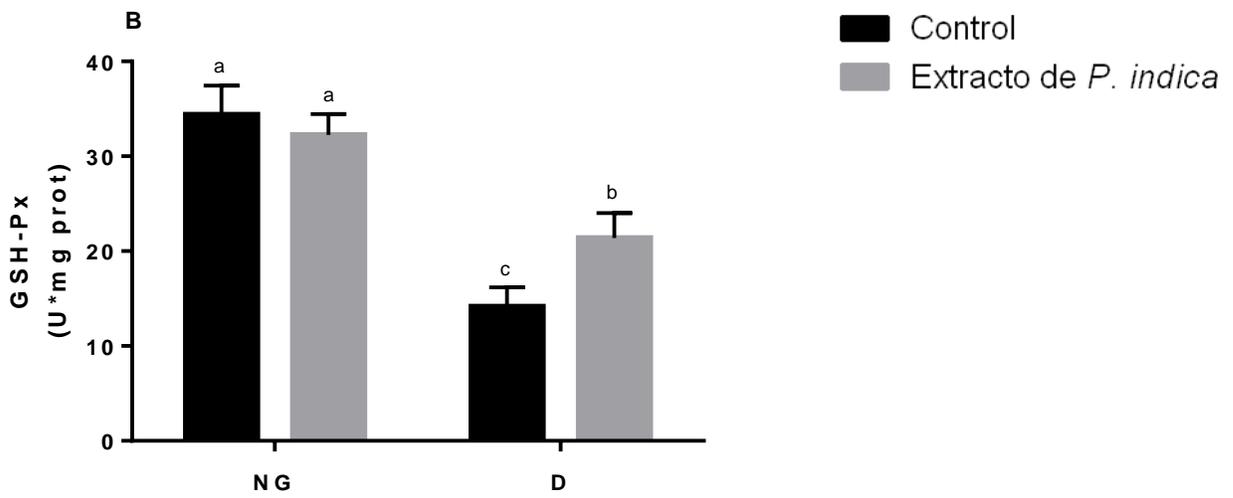
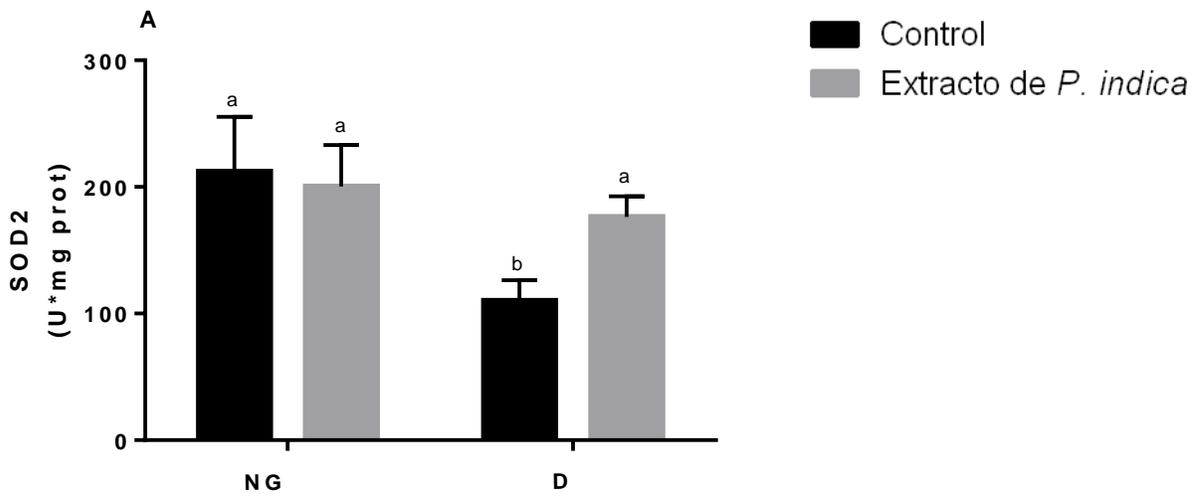
### 8.2.6 Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa

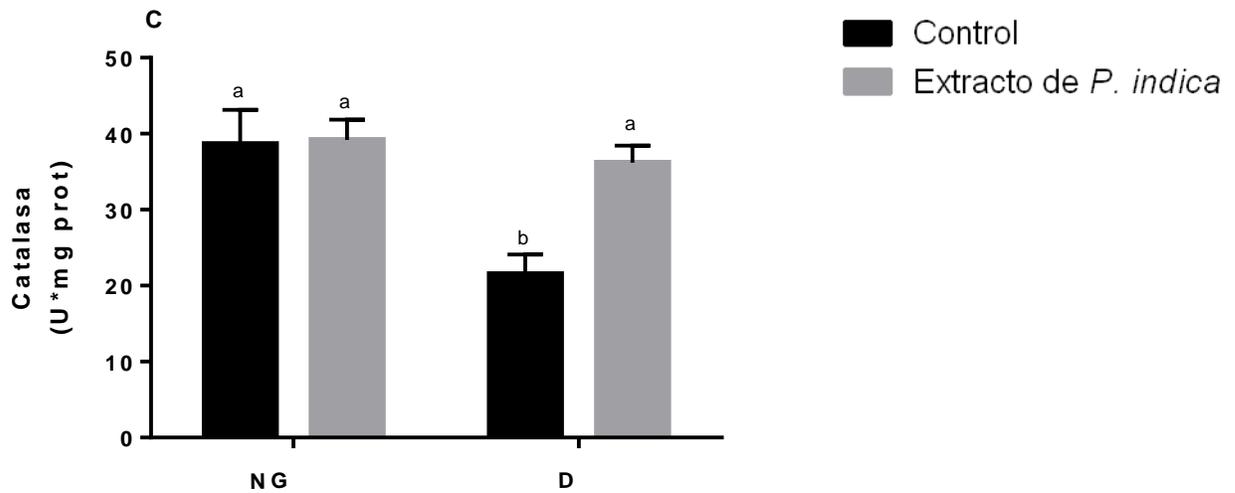
Debido a que se ha demostrado que la actividad del sistema antioxidante de defensa es afectada negativamente en el riñón bajo condiciones diabéticas, debido a la producción excesiva de ERO en dicho órgano, se evaluó el efecto del extracto sobre las actividad de la SOD y GSH-Px en las mitocondrias de riñón, así como la actividad de la CAT en el homogenado de riñón (Figura 8).

Como se puede observar en la figura 8 A y B, hay una disminución significativa en la actividad de la SOD y la GSH-Px en el grupo control diabético ( $110.2 \pm 16.08$  y  $14.1 \pm 2.05$  U \* mg de proteína, respectivamente) en comparación con el grupo control normoglucémico ( $212.1 \pm 43.3$  y  $34.4 \pm 3.08$  U \* mg de proteína, respectivamente). Por el contrario, el grupo diabético tratado con el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* ( $176.5 \pm 16.1$  y  $21.4 \pm 2.6$  U \* mg de prot, respectivamente) demostró una actividad significativamente ( $p < 0.05$ ) mayor en ambas enzimas en contraste con el grupo control diabético.

La actividad de la catalasa se observa en la Figura 8C. Como se muestra, fue significativamente menor en el grupo control diabético ( $21.5 \pm 2.6$  U \* mg de proteína) en comparación con el grupo control normoglucémico ( $38.7 \pm 4.5$  U \* mg de proteína). Por otro lado, el tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *P. indica*, aumentó la actividad de la enzima catalasa en las ratas diabéticas ( $36.2 \pm 2.2$  U \* mg de proteína), siendo estadísticamente similar a los grupos normoglucémicos.

De acuerdo a los resultados anteriores se demostró que el extracto de acetato de etilo de *P. indica* aumenta la actividad de la SOD, la GSH-Px y la CAT bajo condiciones diabéticas, lo que sugiere una disminución del estrés oxidante, el cual afecta la actividad de dichas enzimas.





**Figura 8.** Efecto del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. (A) Superóxido dismutasa; (B) Glutación peroxidasa; (C) Catalasa. Los resultados representan la media  $\pm$  DE, (n = 7-8); basados en la prueba ANOVA de dos vías y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras diferentes indican diferencia significativa  $p < 0.05$ . NG: normoglucémicas; D: diabéticas; DE: desviación estándar.

## 9. DISCUSIÓN

Diversos estudios con modelos diabéticos experimentales han puesto en evidencia que el aumento de la producción de ERO y la disminución de los sistemas antioxidantes de defensa en el riñón inducen daño a nivel glomerular, sugiriendo como factor iniciador del daño renal a la producción excesiva del anión superóxido proveniente de las mitocondrias disfuncionales bajo condiciones de hiperglucemia. Por lo que en este contexto, el estrés oxidante ha demostrado estar fuertemente implicado en la patogenia de la nefropatía diabética (ND) (Fujita *et al.*, 2009; Stanton *et al.*, 2011; Manpreet *et al.*, 2017; Forbes *et al.*, 2018), siendo dicha complicación la principal causa de enfermedad renal crónica (ERC) y la segunda causa de muerte en pacientes diabéticos a nivel mundial (Warren *et al.*, 2019). En la actualidad se cuenta con tratamiento alopático para la DM, sin embargo, su objetivo terapéutico consiste en regular los niveles de glucosa en sangre, sin tomar en cuenta otros factores determinantes en el desarrollo de las complicaciones diabéticas como lo es el estrés oxidante, por lo que una alternativa terapéutica es el empleo de las plantas medicinales con propiedades antioxidantes como una terapia coadyuvante al tratamiento convencional, postergando de esta manera la progresión y desarrollo de la ND.

*Potentilla indica* es una planta perene utilizada en la medicina tradicional asiática, en la cual se ha reportado la presencia de ciertos metabolitos secundarios como ácidos fenólicos, ácido elágico, flavonoides, triterpenos, esteroides, polifenoles y aceites volátiles (Wen *et al.*, 2008 Qiao *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2015), lo que despierta gran interés por sus diversos efectos terapéuticos. Teniendo en cuenta todo lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto antioxidante del extracto de acetato de etilo de *P. indica* tanto *in vitro* como en riñones de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ).

En primera instancia, los resultados *in vitro* demostraron un alto contenido de flavonoides totales presentes en el extracto, seguido de la presencia de terpenoides totales. No obstante, el contenido de ácidos fenólicos fue relativamente menor a lo reportado en extractos alcohólicos de *Potentilla indica* (Qiao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2019). El rendimiento y la extracción de los diferentes metabolitos secundarios dependen del contenido, de la polaridad y de la solubilidad de éstos, así como de la naturaleza de los disolventes empleados. Se ha reportado mayor rendimiento de ácidos fenólicos en

extracciones con solventes polares; así mismo, múltiples estudios han demostrado mayor contenido de flavonoides y de terpenoides en extractos de mediana y baja polaridad (Goli et al., 2005. Somayeh et al., 2017; Montes de Oca-Márquez et al., 2017), por lo que estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, confirmando en este sentido la presencia de metabolitos secundarios de mediana polaridad en el extracto de acetato de etilo de *P. indica*, siendo principalmente los flavonoides.

Los flavonoides son metabolitos secundarios producidos por las plantas, los cuales han sido ampliamente estudiados debido a sus efectos farmacológicos, destacando su propiedad antioxidante (Gulein, 2012; Banjarnahor et al., 2014; Xie et al., 2018). Los mecanismos de acción propuestos por el cual los flavonoides ejercen su efecto antioxidante incluyen: (1) neutralización de los radicales libres mediante la donación de un átomo de Hidrógeno o de la transferencia de un electrón; (2) quelación de metales de transición; (3) suprimiendo a las enzimas asociadas con la generación de ERO; y (4) estimulando la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas (Karak, 2019). En este contexto, el contenido de flavonoides totales presentes en el extracto está relacionado con su potencial antioxidante previamente observado, al inhibir la peroxidación lipídica y donar e<sup>-</sup> al ion férrico y reducirlo a ion ferroso. Sin embargo, su actividad anti-DPPH fue significativamente menor que la del trolox. Esto puede deberse a que los flavonoides extraídos de *P. indica* con acetato de etilo son de polaridad baja y/o intermedia, debido a que se ha reportado que la actividad anti-DPPH es reflejada principalmente en compuestos polares o hidrofílicos, como lo reportó Hseu et al. (2008).

Posteriormente, se evaluó el efecto del extracto sobre un modelo diabético. Para ello, se empleó una dosis de 25 mg/kg debido a que en este estudio se demostró una potente actividad antioxidante *in vitro* y además, porque previamente en nuestro grupo de trabajo se observó un efecto antioxidante en mitocondrias de pulmón de ratas diabéticas inducidas por STZ a esa concentración (Gómez et al., 2018).

La característica principal que define a la DM es la hiperglucemia sostenida (Mezil et al., 2021), por lo que en este contexto, el grupo diabético tratado con el extracto presentó una ligera disminución en los niveles de glucemia, sin embargo, en su mayoría no fueron significativos, por lo que podemos inferir que el extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* no ejerce un efecto hipoglucemiante. Además, la DM está asociada con una reducción

significativa del peso corporal debido a la hiperglucemia crónica, hipoinsulinemia y/o insulinoresistencia (Albasher *et al.*, 2020), así como un aumento de la atrofia muscular y pérdida de proteínas tisulares (Cheng *et al.*, 2013). La administración del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* disminuyó significativamente la pérdida excesiva de peso en las ratas diabéticas, lo que indica la prevención del daño muscular causado por la hiperglucemia.

El estrés oxidante es considerado un factor común que vincula a la hiperglucemia con las complicaciones diabéticas (Gnudi *et al.*, 2007; Group *et al.*, 2015; Manpreet *et al.*, 2017). Así mismo, se ha demostrado una estrecha relación entre la función renal y la mitocondria, debido a la alta demanda energética y de oxígeno requerida por parte de dicho órgano, por lo que se ha postulado que las mitocondrias disfuncionales son fundamentales para el desarrollo y progresión de la ND, ya que dicho orgánulo representa la principal fuente de producción de ERO en el riñón, lo que conduce a un estado de estrés oxidante (Forbes *et al.*, 2018; Daenen *et al.*, 2019). Uno de los mecanismos celulares que comprende la disfunción a nivel mitocondrial bajo condiciones diabéticas consiste en alteraciones en la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones con el subsecuente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno localizada en dos sitios: (1) en el complejo I y (2) en la interfaz entre la conenzima Q y el complejo III (Forbes y Cooper, 2013). En este estudio, se demostró una hiperactividad significativa del complejo I mitocondrial en riñones de ratas diabéticas. Estos datos están en concordancia con lo reportado previamente por Wu *et al.* (2017) y Peña-Montes *et al.* (2020). La hiperactividad del complejo I puede ocurrir en respuesta al desequilibrio redox NADH/NAD<sup>+</sup> debido a la sobreproducción de NADH bajo condiciones de hiperglucemia y probablemente, por modificaciones postraduccionales generadas por el 4-hidroxinonal (HNE) en las subunidades NDUFS1 (75 kDa) y NDUFS2 (53 kDa) del complejo I (Wu *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017).

De igual forma, se observó un aumento significativo de la actividad del complejo II en el grupo control diabético, lo que puede deberse al exceso de la disponibilidad de sustratos bajo condiciones de hiperglucemia, obteniendo cantidades elevadas de FADH<sub>2</sub>. Sin embargo, el aumento de la actividad del complejo I y II se normalizó con la administración del extracto de acetato de etilo de *P. indica* en las ratas diabéticas.

Por el contrario, la actividad de los complejos III y IV, disminuyó significativamente en el grupo control diabético. Se han reportado alteraciones de la actividad del complejo III en mitocondrias aisladas de riñones de modelos diabéticos, debido a modificaciones postraduccionales generadas por la producción excesiva de ERO (Raza *et al.*, 2011; Bernadette *et al.*, 2018). Estos resultados en conjunto, han demostrado un aumento de la actividad del Complejo I-II y una disminución de la actividad del Complejo III-IV bajo condiciones diabéticas, resultados que coinciden con lo reportado por Raza *et al.* (2011), asociándolos a un incremento del flujo inverso de electrones, lo que conlleva a una elevada producción de ERO en la mitocondria. En este contexto, se observó un incremento significativo en la producción de ERO en mitocondrias de riñón del grupo control diabético, lo que probablemente esté relacionado con la disfunción de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria previamente observada. Sin embargo, la administración del extracto evitó significativamente la producción excesiva de ERO bajo condiciones diabéticas. Esto puede deberse a los flavonoides presentes en el extracto, los cuales probablemente estén neutralizando a las ERO generadas en la mitocondria bajo condiciones de hiperglucemia, lo que por consiguiente disminuye el daño oxidativo, previniendo las modificaciones postraduccionales en las subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales, lo que incide a que no haya alteraciones en su actividad (Figura 9).

Se ha reportado un aumento del estrés oxidante en pacientes diabéticos (Forrester, 2018). Así mismo, modelos experimentales diabéticos inducidos con STZ, han puesto en evidencia un incremento de la producción de ERO. Las ERO son capaces de oxidar a las biomoléculas circundantes tales como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando alteraciones en su estructura y funcionalidad. Los lípidos de la membrana mitocondrial son susceptibles al daño oxidativo generado por los RL (Haunk y Bernlohr, 2017). El anión hidroxilo (OH<sup>-</sup>), principalmente, reacciona con los lípidos poliinsaturados de la membrana mitocondrial, abstrayendo un átomo de Hidrógeno del Carbono en la posición bis-alílica dando inicio al daño oxidativo (Barrera *et al.*, 2018). La peroxidación lipídica en las membranas mitocondriales puede generar alteraciones en la permeabilidad, en la respiración celular, en el ensamblaje, estabilidad y actividad de las proteínas unidas a la membrana, anormalidades en la morfología mitocondrial e incluso puede promover la muerte celular (Bindoli, 2004). La oxidación de los lípidos propiciada por las ERO genera hidroperóxidos, que posteriormente se fragmentan para

producir una amplia gama de intermediarios reactivos, como el malondialdehído (MDA). El MDA es uno de los biomarcadores más utilizados para determinar la peroxidación de lípidos, ya que éste reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar los productos conocidos como "sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico" (TBARS) (Reitznerova *et al.*, 2017). En este sentido, se observó un incremento de los niveles de TBARS en las mitocondrias de riñón de las ratas control diabéticas, lo que indica un aumento del daño oxidativo sobre los lípidos de la membrana mitocondrial renal, provocado por la producción excesiva de ERO. Sin embargo, la administración del extracto disminuyó los niveles de peroxidación lipídica en el grupo diabético tratado, resultado que correlaciona con la disminución de la producción de ERO y la restauración de la actividad de los complejos mitocondriales, previamente observadas en el grupo diabético tratado. Esto puede deberse al efecto de los flavonoides presentes en el extracto, que estén neutralizando a las ERO generadas en la mitocondria a través de la donación de electrones (Chantal *et al.*, 2002; Schmatz *et al.*, 2012; Obafemi *et al.*, 2017) y/o quelando metales de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^+$ , disminuyendo la formación del radical  $OH^{\cdot}$  por la reacción de Fenton, y evitando así el daño oxidativo hacia los lípidos (Figura 9). Estos resultados coinciden con lo previamente reportado por Hu *et al.* (2011), quienes observaron una actividad antioxidante por parte de *P. indica* al disminuir los niveles de ERO y MDA, evaluados en un modelo *in vivo*.

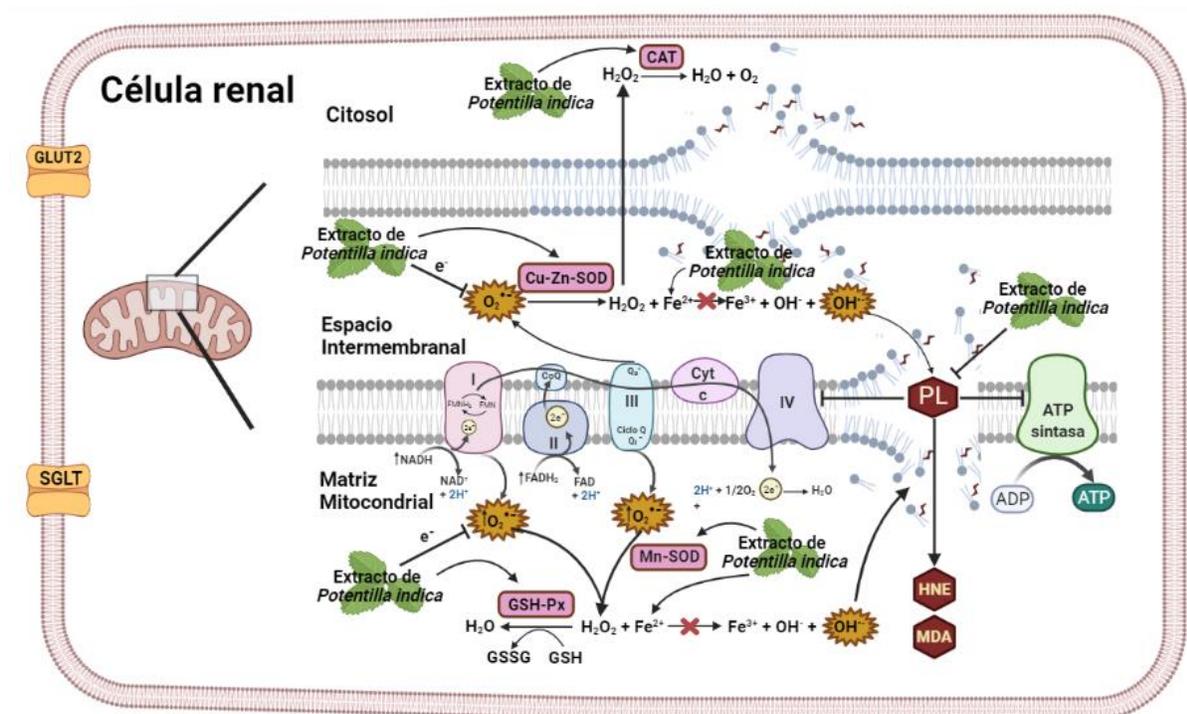
Parte del sistema antioxidante de defensa que comprende a las células renales incluye a las enzimas SOD, GSH-Px y CAT, cuya actividad se ve alterada bajo condiciones de hiperglucemia (Pari y Latha, 2004). No obstante, hay muchas controversias sobre la actividad observada de la SOD, CAT y GSH-Px en modelos experimentales diabéticos. Algunos estudios han reportado una disminución de la actividad de dichas enzimas (Obrosova *et al.*, 2003; Punitha *et al.*, 2005), mientras que otros sugieren un aumento de la actividad enzimática (Genet *et al.*, 2012). Dichas discrepancias pueden deberse al tipo de tejido utilizado, al periodo experimental, a la dosis del agente diabetogénico empleado, así como la severidad de la diabetes. En este estudio se demostró una reducción significativa de la actividad de la SOD, GSH-Px y CAT en las mitocondrias (SOD y GSH-Px) y el homogenado (CAT) de riñón del grupo control diabético en comparación con el grupo control normoglucémico. Por otro lado, se observó un aumento significativo de la actividad para las tres enzimas en el grupo diabético tratado con el extracto. La disminución de la actividad de la SOD, GSH-Px y CAT en el riñón

bajo condiciones diabéticas, puede deberse a la inactivación enzimática causada por glucosilación y/o la elevada producción de ERO (Frode *et al.*, 2008; Jayaraman *et al.*, 2018;). No obstante, el tratamiento con el extracto de acetato de etilo de *P. indica* incrementó la actividad de estas enzimas, debido probablemente a los flavonoides presentes, ya que se ha reportado en la literatura que ciertos flavonoides actúan como activadores del factor nuclear Nrf2, factor transcripcional que promueve la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (Leonardo y Doré, 2011), las cuales pueden estar contrarrestando el EO propiciado por las ERO generadas durante la DM. Estos resultados coinciden con lo reportado por Saio *et al.* (2012), en donde observaron un aumento de la actividad enzimática de la SOD, GSH-Px y CAT en riñones de ratones diabéticos, después de la administración de un extracto metanólico de *Potentilla fulgens*, por lo que concluyeron que se trataba de una potente actividad antioxidante.

La sobreproducción de ERO inducida por la hiperglucemia crónica, provoca daño oxidativo en células renales tales como células mesangiales, células endoteliales glomerulares y podocitos, alterando la filtración glomerular y aumentando la permeabilidad de la membrana (Madianov *et al.*, 2000). Los marcadores bioquímicos séricos utilizados para evaluar la función renal fueron nitrógeno ureico (BUN), el cual proviene del metabolismo de las proteínas; ácido úrico, producto final del catabolismo de bases púricas; y creatinina, la cual proviene de la degradación de la creatina. Al ser productos de desecho provenientes del catabolismo de compuestos nitrogenados, éstos son filtrados por el riñón y excretados a través de la orina (Rodríguez de Cossio, 2011). En este contexto, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de los niveles de BUN y creatinina sérica en el grupo control diabético, en comparación con el grupo control normoglucémico. El aumento del BUN y la creatinina en suero son indicativo de daño renal, lo que implica una disminución de la excreción renal de estos compuestos (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, en las ratas diabéticas tratadas con el extracto, hubo una disminución significativa en los niveles de BUN y creatinina sérica. Esto puede deberse al efecto protector contra el EO ejercido por los flavonoides presentes en el extracto, mejorando la condición diabética y con ello la función renal.

De acuerdo al conjunto de resultados obtenidos en este estudio, se puede sugerir que el extracto de acetato de etilo de *P. indica* posee flavonoides capaces de reducir significativamente el

estrés oxidante, demostrando así un papel protector sobre el daño renal inducido por la hiperglucemia crónica.



**Figura 9.** Mecanismo de acción propuesto sobre el efecto antioxidante del extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* en la célula renal bajo condiciones diabéticas. Lo anterior fue elaborado de acuerdo a los resultados obtenidos y a los mecanismos generales descritos en la literatura para los flavonoides. El mecanismo propuesto implica la neutralización a través de la donación de un  $e^-$  al  $O_2^{\bullet-}$  generado en los principales sitios de producción de ERO en la mitocondria, el complejo I y el complejo III de la CTE, así como también actuando como agente quelante de metales de transición como el ion  $Fe^{2+}$ , suprimiendo la formación del radical  $OH^{\bullet}$  a través de la reacción de Fenton, siendo éste el principal oxidante de los lípidos de membrana, por lo que en este sentido disminuye el daño oxidativo hacia los lípidos de la membrana mitocondrial, previniendo además las modificaciones postraduccionales en las subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales lo que incide a que no haya alteraciones en su actividad, y con ello a una disminución de la producción de ERO en la mitocondria, y finalmente incrementando la actividad enzimática antioxidante.

## 10. RESUMEN DE RESULTADOS

- El extracto de acetato de etilo de *P. indica* exhibe actividad antioxidante *in vitro* debido a que los MS extraídos, principalmente flavonoides, mostraron un efecto protector ante la peroxidación lipídica, así como un efecto reductor sobre el  $\text{Fe}^{+3}$ .
- El extracto de acetato de etilo de *P. indica* ejerce un efecto protector a nivel renal, ya que disminuye los niveles de BUN y creatinina sérica bajo condiciones diabéticas.
- El extracto de acetato de etilo de *P. indica* mejora la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales bajo condiciones diabéticas.
- El extracto de acetato de etilo de *P. indica* presenta actividad antioxidante *in vivo* en mitocondrias de riñón, ya que reduce la producción de ERO, la peroxidación lipídica y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa en ratas diabéticas.

## **11. CONCLUSIÓN**

El extracto de acetato de etilo de *Potentilla indica* presenta actividad antioxidante *in vitro* y en mitocondrias de riñón, debido al contenido de flavonoides totales extraídos, los cuales mejoraron la condición diabética y ejercieron un efecto protector de daño renal.

## 12. REFERENCIAS

1. Al-Awar, A., Kupai, K., *et al.* (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Journal of Diabetes Research*. 1-12.
2. Albasher, G., Alwahaibi, M., Abdel-Daim, M., Alkahtani, S., Almeer, R. (2020). Protective effects of *Artemisia judaica* extract compared to metformin against hepatorenal injury in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Environ Sci Pollut Res*.
3. American Diabetes Association. Diagnoses and Classification of Diabetes Mellitus. (2014). *Diabetes Care*. 37: 581-590.
4. Asayama, K. y Burr I. M. (1996). Rat superoxide dismutases. *Journal of biological Chemistry*. 260(4): 2212-2217.
5. Ávila-Acevedo J.G., García-Bores, A.M., Martínez-Ramírez F., HernándezDelgado C.T, Ibarra-Barajas, M., Romo de Vivar, A., Florez-Maya, S., Velasco-Lara, P., Céspedes, C.L. (2012). Antihyperglycemic effect and genotoxicity of *Psittacanthus calyculatus* extract in streptozotocin induced diabetic rats. *BLACMA* 11(4):345-353
6. Barrera, G., *et al.* (2018). Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants*. 7, 102.
7. Bellik, Y., Hammoudi, S.M., Abdellah, F., Iguer-Ouada, M., y Boukraâ, L. (2012). Phytochemicals to prevent inflammation and allergy. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov*. 6(2):147-58.
8. Bhaskar, H.V y N. Balakrishnan. (2009). In Vitro antioxidant property of Laticiferous plant species from Western Ghats Tamil Nadu, India. *International Journal Health Research*, 2: 163-170.
9. Bindoli, A. (2004). Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med*. 5, 247-261.
10. Bolton, W.K., Cattran, D.C., Williams, ME. (2004). Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 24:32-40.

11. Boulebd, H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. (2019). *Journal of Molecular Structure*.
12. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., y Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25–30.
13. Buege, J.A., y Aust SD. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52(C): 302-10.
14. Casado, R., Land, A., Calvo, J., Terencio M.C., y Calvo, M.I. (2010). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Jungia paniculata*. *Pharmaceutical Biology*. 48(8):897-905.
15. Castillo, R., Huerta, P., Carrasco, R y Rodrigo R. (2003). Estrés oxidativo y daño renal. *Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamerica*, 8(1): 43-52.
16. Céspedes, T., Sánchez, D. (2000). Algunos Aspectos sobre el Estrés Oxidativo y la Terapia de Suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*. 14(1):55-60.
17. Chantal, G.M., Heijnen, Guido R.M.M., Haenen, R., Minou Oostveen, Eva M. Stalpers & Aalt Bast. (2002). Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation: The Structure Activity Relationship Revisited. *Free Radical Research*. 36:5, 575-581
18. Cheng, D., Wang, P., Huang, J., Yang, B., Ma, M., Yu, P., Zeng, Z., Gong, D., Deng, S. (2020). Antioxidant, antidiabetic and identification of phenolic constituents from *Potentilla discolor* Bge. *European Food Research and Technology*. 246: 2007-2016.
19. Corrales-Constanza, L., Muñoz-Ariza, M.M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista de Ciencias Biomédicas*. 10: 135 – 250.
20. Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Uribe, S., Boldogh, I., Saavedra-Molina, A. (2007). Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radical Reserch*. 41(11), 1212-1223.
21. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*, 51(2), 117-123.

22. Cruz-Hernández, J., Licea-Puig, M., Hernández-García, P., Abraham-Marcel, E., Yanes-Quesada, M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 58: 4-15.
23. Diaz-Flores, M., Baiza-Gutman L.A., Ibáñez-Hernández M.A., Pascoe-Lira D., Guzmán-Greenfel A.M y Kumate-Rodríguez J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Medica de México*, (40):4 437-447.
24. Ebrahimzadeh, A.M., Nabavi F.Z y Nabavi M.S. (2009). Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium caucasicum* Trautv at flowering stage. *Pharmacognosy Research*, 1: 435-439.
25. Edeoga, H.O., Okwu, D.E., y Mbaebie, B.O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(7):685-688.
26. Eid S, Sas KM, Abcouwer SF, Feldman EL, Gardner TW, Pennathur S, Fort PE. (2019). New insights into the mechanisms of diabetic complications: role of lipids and lipid metabolism. *Diabetologia*. 62:1539–1549.
27. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. Informe final de resultados de ENSANUT MC, 2016.
28. Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Saavedra-Molina, A. y Salgado-Garciglia R. (2013). Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties. *Pharmacology Online Newsletter* 2: 15-23.
29. Fernández-Mejía, C. 2013. Molecular basis of type 2 diabetes. 88-108.
30. Forbes, J., Thorburn, D. (2018). Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 14(5): 291–312.
31. Forbes, J.M., Coughlan, M.T. & Cooper, M.E. (2008). Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes*. 57: 1446-1454.
32. Forrester, J.S., Kikuchi, S.D., Hernandez, M.S., Xu, Q., Griendling, K.K. (2018). Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research*. 122: 877–902.
33. Fowler, M.J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 26:2, 77-82.

34. Fröde, T.S.; Medeiros, Y.S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J Ethnopharmacol.* 115, 173-83.
35. Fujita, H., Fujishima, H., Chida, S., Takahashi, K., Qi, Z., Kanetsuna, Y., Breyer, M.D., Harris, R.C, Yamada, Y., and Takahashi, T. (2009). Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 20: 1303-1313.
36. García-Cerrillo, D., Noriega-Cisneros, R., Pena-Montes, D., Huerta-Cervantes, M., Ríos-Silva, M., Salgado-Garciglia, R., Montoya-Pérez, R., & Saavedra-Molina A. (2018). Antioxidant Effects of *Eryngium carlinae* in Diabetic Rats. *Asian Journal of Applied Sciences.* 6(5), 308-314.
37. Genet, S., Kale, R.K., Baquer, N.Z. (2012) Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem.* 236, 7–12.
38. Ghorai, N., Chakraborty, S., Guchait, S., Saha, S.K., Biswas, S. (2012). Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standart reagent. *Protocol Exchange.* 5(10):1038.
39. Gnudi, L.; Thomas S.M.; Viberti, G. (2007). Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism, *JASN.* 18, 8, 2226-32
40. Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry,* 92(3), 521-525.
41. Gómez B, *et al.* (2018). Evaluación del efecto antioxidante del fruto de *Potentilla indica* en pulmones de ratas diabéticas. [Tesis de maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
42. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry.* 177(2), 751-766.
43. Goutos, I., Nicholas, R.S., Pandya, A.A., y Ghosh, S.J. Diabetes mellitus and burns. Part I-basic science and implications for management. (2015). *International Journal of Burns and Trauma.* 1: 1-12.
44. Granados-Sánchez, D., P. Ruíz-Puga y H. Barrera-Escorcía. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(1): 51 – 63.

45. Group, D.E.R., de Boer I.H., Sun W., Cleary P.A., Lachin J.M., Molitch M.E., Steffes M.W., Zinman B. (2011). Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 365. 25, 2366-76.
46. Guillamón, E. (2018). Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars. Pharmaceutica*, 59(3):185-196.
47. Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
48. Gushiken, F.L., Beserra, P.F., Rozza, L.A., Bérnago, L.P., Bérnago, D.A. y Pellizzon H.C. (2016). Chemical and biological aspects of extracts from medicinal plants with antidiabetic effects. *The Review of DIABETIC Studies*, 93(2-3):1-17.
49. Harman-Ware, A. E., Sykes, R., Peter, G. F., y Davis, M. (2016). Determination of terpenoid content in pine by organic solvent extraction and fast-GC analysis. *Frontiers in Energy Research*. 4:1-9.
50. Haunk, A. K. y Bernlohr, D. A. (2017). Oxidative stress and lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*. 57: 1976-1986
51. Hernandez, C.J., Piug, L.M.E., García, H.P., Marcel, A.E.A., y Quesada, Y.M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, (58):1 4-15.
52. Hernández-Guerra, J., Rodríguez-Gómez, A., Villafuerte-Reinante, J., Marrero-Silva, I., Mora-Hernández C.M. (2020). Influence of Free Radicals in the Origin of Atherosclerosis. *Rev. Finlay*. (10): 2, 2221-2434.
53. Hortelano, S. (2009). Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*. 8(1):28-39.
54. Hseu, Y., Chang, W., Chen, C., Liao, J., Huang, C., Lu, F., Chia, Y., Hsu, H., Wu, J., Yang, H. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1,105-114.
55. Hu, W., Han, W., Huang, C., & Wang, M. H. (2011). Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress in vitro and in vivo. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 31(1), 42-50.

56. Hu, W., Shen, W., & Wang, M. H. (2009). Free radical scavenging activity and protective ability of methanolic extract from *Duchesnea indica* against protein oxidation and DNA damage. *Preventive Nutrition and Food Science*.14(4), 277-282.
57. International Diabetes Federation. (2019). Atlas de la Federación Internacional de Diabetes. Novena edición.
58. Jayaraman, R., et al. (2018). Antihyperglycemic effect of hesperetin, a citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 98–106. doi:
59. Jeulin, C., Soufir, J.C., Weber, P., Laval-Martin, D. Calvayrac, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete. Res.* 1989, 24, 185–196.
60. Neha, K., Haider, M.R., Pathak, A., Yar, M.S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*.
61. Karak, J. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *IJPSR*. 10(4): 1567-1574.
62. Kashihara, N., Haruna, Y., Kondeti, V.K., Kanwar, Y.S. (2010). Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Curr. Med. Chem.* 17, 4256-4269.
63. Kim, J.M., Jang, D.S., Lee, Y.M., Yoo, J.L., Kim, Y.S., Kim, J.H., Kim, J.S. (2008). Aldose reductase and protein glycation inhibitory principles from the whole plant of *Duchesnea chrysantha*. *Chemistry and Biodiversity*. 5(2), 352-356.
64. Kim, D.O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 50(13):3713-3717.
65. Kim, G. J., Choi, H. G., Kim, J. H., Kim, S. H., Kim, J. A., y Lee, S. H. (2013). Anti-allergic inflammatory effects of cyanogenic and phenolic glycosides from the seed of *Prunus persica*. *Natural Product Comm.* 8(12):1739-1740.
66. Kim, I. G., Jung, I. L., Oh, T. J., Kim, K. C., Shim, H. W. (2002). Polysaccharide-enriched fraction isolated from *Duchesnea chrysantha* protects against oxidative damage. *Biotechnology Letters*. 24(16), 1299-1305.
67. Kitada, M., Zhang, Z., Mima, A., King, G.L. (2010). Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *Journal of Diabetes Investigation*. 1: 77-89.

68. Kuang, Q.T., Zhao, J.J., Ye, C.L., et al. Nephroprotective effects of total triterpenoids from *Psidium guajava* leaves on type 2 diabetic rats. *Zhong Yao Cai*. 2012;35(1):94–97.
69. Kumaran, A. y Karunakaran J.R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Food Science and Technology*, 40:344–352.
70. Lawrence, R.A., Burk, R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958.
71. Lee, I.R., Yang, M.Y. (1994). Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activities in human cancer cell. *Archives of Pharmacal Research*. 17(6), 476-479.
72. Lee, J.S., Kim, I.S., Ryu, J.S., Kim, J.H., Kim, J.S. Kim, D.H., & Yun, C.Y. (2012). The inhibitory effect of *Duchesnea chrysantha* extract on the development of atopic dermatitis like lesions by regulating IgE and cytokine production in Nc/Nga mice. *Phytotherapy Research*. 26(2), 284290.
73. Leonardo, C., y Doré, S. (2011). Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins. *Nutr. Neurosci.* 14(5), 226-237.
74. Li, M., Wang, W., Xue, J., et al. (2011). Meta-analysis of the clinical value of *Astragalus membranaceus* in diabetic nephropathy. *Journal Ethnopharmacology*. 133:412–419.
75. López-Carreras, N., Miguel, M., Alexandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*. 32(3):81-92.
76. Macedo-Márquez, A. La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. (2012). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(2): 97-103.
77. Madianov, I.V., Balabolkin, M.I., Markov, D.S., Markova, T.N. Main causes of hyperuricemia in diabetes mellitus. *Ter Arkh.* 2000; 72, 2, 55-58.
78. Manpreet, K., Sagoo and Luigi Gnudi, (2017). Diabetic nephropathy: is there a role for oxidative stress?. *Free Radic. Biol. Med.*

79. Maruthamuthu, V. y Kandasamy. R. (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11: 570-572.
80. Merina, A., Sivanesan, D., Hazeena, B.V., Sulochana, V. (2010). Antioxidant and hypolipidemic effect of *Plumeria rubra* L. in alloxan induced hyperglycemic rats. *European Journal of Advanced Chemistry Research*. 7(1):1-5.
81. Mezil, S., Ahmed, B. Complications of Diabetes Mellitus. (2021). *Annals of R.S.C.B.* 25, 1546-1556.
82. Milda E. Embuscado. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants: a mini review, *Journal of Functional Foods*. (18): 811-819.
83. Montes-de-Oca-Márquez, C., Hernández-Delgado, C., et al. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Dalea carthagenensis* (JACQ.) J. F. MACBR. *Rev. Fitotec. Mex.* 40 (2): 161–168.
84. Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada, I., Ortiz-Vázquez E., Betancur, D. y Sauri, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*. 166:17-22
85. Mora-Fernández, C., Macía Heras, M., Martínez-Castelao, A., de al Varo Moreno J.I., Navarro-González, J. F. (2008). Fisiopatología de la nefropatía diabética. *Nefroplus*. 1:1.
86. Muthenna, P., Raghu, G., Kumar, P.A., et al. (2014). Effect of cinnamon and its procyanidin-B2 enriched fraction on diabetic nephropathy in rats. *Chem Biol Interact*. 222C:68–76.
87. Nasri, H., Shirzad, H., Baradaran, A., Rafieian-kopaei, M. (2015). Antioxidant plants and diabetes mellitus. *Journal of Research in Medical Science*. 20:491–502.
88. Noori, A., Hamza, A., Thia, A., Khelod, S. (2017): Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials. *Redox Report*.
89. Obafemi, O.T., et al. (2017). Antidiabetic potential of methanolic and flavonoid-rich leaf extracts of *Synsepalum dulcificum* in type 2 diabetic rats. *J Ayurveda Integr Med*.

90. Obrosova, I.G., Fathallah, L., Liu, E., and Nourooz-Zadeh, J. (2003). Early oxidative stress in the diabetic kidney effect of dl-lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2): 186-195.
91. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes de la OMS, 2016.
92. Ortiz-Avila, O., Sámano-García, C.A., Calderón-Cortés, E., Pérez-Hernández, I.H., MejíaZepeda, R., Rodríguez-Orozco, A.R., Saavedra-Molina, A., Cortés-Rojo, C. (2013). Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *Journal of Bioenergetics of Biomembranes.* 45(3), 271-287.
93. Özkaya, Y.G., Ag, A., Yargıçog, P., Hacıoglu, G., Bilmen-Sarikçiog, S., Özen, I., Alicigüzel, Y. (2008). The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats.
94. Paduch, R., Wiater, A., Locatelli, M., & Tomczyk, M. (2015). Aqueous extracts of selected *Potentilla* species modulate biological activity of human normal colon cells. *Current Drug Targets.* 16(13), 1495-1502.
95. Pari, L., and Latha, M. (2004). Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipid peroxidation in STZ diabetic male Wistar rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 4: 16-24.
96. Peña-Montes, D.J., Huerta-Cervantes, M., Ríos-Silva, M., Trujillo, X., Cortés-Rojo, C.; Huerta, M., Saavedra-Molina, A. (2020). Effects of dietary iron restriction on kidney mitochondria function and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Mitochondrion.* 54, 41–48.
97. Peng, B., Chang, Q., Wang, L., Hu, Q., Wang, Y., Tang, J., & Liu, X. (2008). Suppression of human ovarian SKOV-3 cancer cell growth by *Duchesnea* phenolic fraction is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Gynecologic Oncology.* 108(1), 173-181.
98. Peng, B., Hu, Q., & Liu, X. (2009). *Duchesnea* phenolic fraction inhibits *in vitro* and *in vivo* growth of cervical cancer through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Experimental Biology and Medicine.* 234(1), 74-83.
99. Plants DB. 2016. *Duchesnea indica* (Falsa fresa). Disponible en <http://www.plantsdb.gr/es/plants-library/herbaceous/313-duchesnea-indica>.

100. Pozniakovskiy, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P., Severin, F.F. (2005). Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *The Journal of Cell Biology*. 168: 257–269
101. Punitha, I.S.R., Rajendran, K., Shirwaikar, A., and Shirwaikar, A. (2005). Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Evid.-Based. Compl. 625 Alt. Med.* 2(3): 375-381
102. Qiao, W., Yao, Z., Zhang, W., Duan, H.Q. (2009). Two new triterpenes from *Duchesnea indica*. *Chinese Chemical Letters*, 20, 572-575.
103. Qiao, W., Zhao, C., Qin, N., Zhai, H. Y., Duan, H. Q. (2011). Identification of trans-tiliroside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects from *Potentilla chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* (135): 515-521
104. Qin, C., Li, Y., Zhang, R., Niu, W., Ding Y. (2009). Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mock strawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Natural Product Research*. (23): 1589–1598.
105. Ramos-Ibarra, M.L., Batista-González, C.M., Gómez-Meda, B.C., Zamora-Pérez, A.L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en Salud*. (1): 1405-7980.
106. Reitznerova, A., et al. (2017). Lipid Peroxidation Process in Meat and Meat Products: A Comparison Study of Malondialdehyde Determination between Modified 2-Thiobarbituric Acid Spectrophotometric Method and Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules*. 22.
107. Renno, W.M., Abdeen, S., Alkhalaf, M., et al. (2008). Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *British Journal of Nutrition*. 100:652–659.
108. Richard, A., Lawrence & Raymond F.B. (1978). Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 71(4), 952-968.
109. Rivera-Ramírez, F., Escalona-Cardoso, G.N, Garduño-Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C., Paniagua-Castro, N. (2011). Antiobesity and hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonora* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1:1-6.

110. Rodríguez de Cossio, A., Rodríguez-Sánchez, R. (2011). Pruebas de laboratorio en atención primaria (II). *Semergen*. 37(3):130-135.
111. Rzedowski, J. & Calderón, G. (2005). Rosaceae. Flora del bajo y de regiones adyacentes. 135, 1-163.
112. Saavedra-Molina, A., Devlin, T.M. (1997). Effect of extra- and intra- mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids*. 12 (3-4): 293-298.
113. Saio, V., Syiem, D. y Sharma, R. (2012). Effect of *Potentilla fulgens* on lipid peroxidation and antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* (3): 249-254
114. Salinas, C.V., Reyes, M.E. y Escorza, Q.M. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Diabetes y Oxidación*, 32(2): 53-66.
115. Schmatz, R., Perreira, B.L., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., Gutierrez, J., Bagatini, M., Martins, C.C., Abdalla, H.F., Serres, S.D.J., Zanini, D., Vieira, M.J., Cardoso, M.A., Schetinger R.M y Morsch M.V. (2012). Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin induced diabetic rats. *Biochimie*, 94:374-383.
116. Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L., Gardner, P., Heinonem, M., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L., Tijburg, L. (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, 212(3):319-328.
117. Şekeroğlu, M.R., Sahin, H., Dülger, H., Algün, E. (2000). The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry*, 33(8), 669-674.
118. Sen, S.S., Sukumaran, V., Giri, S.S., *et al.* (2015). Flavonoid fraction of guava leaf extract attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF- $\kappa$ B signalling pathway in *Labeo rohita* macrophages. *Fish Shellfish Immunol*. 47(1):85-92

119. Sepúlveda, G., H. Porta Ducoing y M. Rocha Sosa. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3): 355 – 363.
120. Somayeh, A., Mohammad, T.M., Majid A.S., & Zahra L. (2017). Antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts and fractions of *Pistacia atlantica*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(4), 293-297.
121. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L., Angelini, C. (2012). Assessmet of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultures cells. *Nature protocols*. 7(6), 1235-1246. Stanton, R.C. (2011), Oxidative Stress and Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 11, 330–336.
122. Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. *Sunderland: Sinauer* 3ª edición
123. Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega K, *et al.* (2012). Curcumin I induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012:269039.
124. Ting, H., Xiao, L., Xiaoping, W., *et al.* (2020). Chemical composition and anti-oxidant potential on essential oils of *Thymus quinquecostatus Celak.* from Loess Plateau in China, regulating Nrf2/Keap1 signaling pathway in zebrafish. *Scientific Reports*. 10:11280.
125. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., y Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction, A review. *International Journal of Pharmaceutica Scientia*, 1 (1):98-106.
126. Tomovic, M.T., Cupara, S. M., Popovic-Milenkovic, M.T., Ljubic, B.T., Kostic, M.J., & Jankovic, S.M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Potentilla reptans* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 72(1), 137-145.
127. Tun, N.N., Holk A., Scherer G.F.E. (2001). Rapid increase of no release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*. 509:174-176.
128. Wang, C.X., Lv, L.S., Huang, H., Guan, J.Q., Ye, Z., Li, S.M., *et al.* (2017). Initiation time of renal replacement therapy on patients with acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of 8179 participants. *Nephrology*. 22, 1, 7-18.

129. Wang, S.S., Wang, D.M., Pu, W.J., Li, D.W. (2013). Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 321.
130. Warren, M.A., Knudsen, S.T., Cooper, M.E. (2019). Diabetic nephropathy: an insight into molecular mechanisms and emerging therapies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 23:7, 579-591.
131. Wen-dong, X., Hou-Went, Q., Feng, Q. Study on chemical constituents of *Duchesnea indica* Andr. Focke. (2008). *Acad. J. Second Mil. Med. Univ.*
132. Wu, J., Luo, X., Thangthaeng, N., Sumien, N., Chen, Z., Rutledge, M.A., Jing, S., Forster, M.J.; Yan, L.J. (2017). Pancreatic mitochondrial complex I exhibits aberrant hyperactivity in diabetes. *Biochem. Biophys. Rep.* 11, 119–129.
133. Wu, J., Luo, X., Yan, L.J. Two dimensional blue native/SDS-PAGE to identify mitochondrial complex I subunits modified by 4-hydroxynonenal (HNE). (2017). *Front. Physiol.* 2015, 6, 98.
134. Xiang-Hui, J., Jian-Qiang, G., Chao-Wen, S., Liu, X.M. (2012). High frequency shoot organogenesis in juvenile leaf of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke. *African Journal of Biotechnology*. 11(17), 4039-4044.
135. Xie, J., Wang, W., Dong, C., Huang, L., Wang, H., Li, C., Nie, S., Xie, M. (2018). Protective effect of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* leaves against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice, *Food and Chemical Toxicology*.
136. Yang, E.J., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., & Kim, I.S. (2008). Inhibitory effects of *Duchesnea chrysantha* extract on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *Journal Ethnopharmacology*. 118(1), 102–107.
137. Yuan, T., Yang, T., Chen, H., Fu, H., Hu, Y., Xu, W., Xie, X. (2019). New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biology*. 20: 247-260.
138. Zentella de Piña, M., Villalobos-Molina, R., Saavedra-Molina, A., Riveros-Rosas, H., Piña, E. (1989). Effects of moderate chronic ethanol consumption on rat liver mitochondrial functions. *Alcohol*. 6(1), 3-7.

139. Zhang, L., Yang, J., Chen, X., Zan, K., Wen, X., Chen, H., Wang, Q. (2010). Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology* (132): 518-524
140. Zhu, M., Dong, X., Guo, M. (2015). Phenolic Profiling of *Duchesnea indica* Combining Macroporous Resin Chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT- MS. *Molecules*, 20(12), 22463-22475.