



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

EFFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE  
*Chirantodendron pentadactylon* Larreat. (FLOR  
DE MANITA) SOBRE LA NEFROPATÍA  
DIABÉTICA EN RATAS CON DIABETES  
MELLITUS.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**IVÁN EMMANUEL BARRERA CARAPIA**

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. David Segura Cobos

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2021





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, que me han apoyado todos estos años, alentándome a siempre tratar de dar lo mejor de mí y más cuando es posible, siempre creyendo en que yo podía lograr grandes cosas, y esta meta será solo la primera de ellas.*

*A mis hermanas por haberme ayudado siempre que les fue posible, especialmente Alejandra, gracias por tu tiempo y tu paciencia durante tantos años.*

*A los buenos amigos que encontré a lo largo de la carrera, principalmente Andrea, sin tí todas esas clases de diversidad y viajes de autobús en las prácticas de campo no habrían sido lo mismo, gracias por ser como eres con todo y tus peculiaridades y por todos los momentos juntos.*

*A todos los profesores que me enseñaron y orientaron durante cada uno de los semestres, gracias a ellos pude llegar hasta aquí y poder dar un paso más en el camino a lograr mis objetivos en esta vida, siempre atesoraré su tiempo y sus lecciones, tanto académicas como de vida.*

*A los laboratorios de farmacognosia (UBIPRO), fitoquímica (UBIPRO), biología del desarrollo e histología (UMF) por su apoyo en la realización del trabajo.*

*Al maestro David Segura, por todo el tiempo que pasó conmigo en el laboratorio, por su ayuda cuando las cosas parecían volverse más complicadas y su paciencia para mostrarme el camino a recorrer, este trabajo no hubiera sido posible sin usted.*

*Y finalmente un agradecimiento especial a la Dra. Beatriz Vázquez (q.e.p.d.), siento mucho que no haya podido ver el trabajo concluido, le agradezco la oportunidad de formar parte del laboratorio, su confianza, su tiempo y por todo el apoyo que nos brindó.*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1. DIABETES MELLITUS</b>	<b>3</b>
1.1 CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES	3
1.2 DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MELLITUS	6
1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA DM	6
1.4 COMPLICACIONES DE LA DM	6
<b>2. NEFROPATÍA DIABÉTICA.</b>	<b>8</b>
2.1 FASES DE LA ND	9
2.2 DESARROLLO DE LA ND	10
2.3 RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO	10
2.4 AUTOOXIDACIÓN DE LA GLUCOSA Y PRODUCTOS DE GLUCOSILACIÓN AVANZADA (AGE)	11
2.5 VÍA DE LOS POLIOLES O DEL SORBITOL	11
2.6 VÍA DE LAS HEXOSAMINAS	12
2.7 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	12
<b>3. ANTIOXIDANTES EN LA ND</b>	<b>14</b>
<b>4. USO DE PLANTAS ANTIOXIDANTES EN LA DM</b>	<b>15</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>8. METODOLOGÍA</b>	<b>20</b>
8.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO	20
8.2. PRUEBAS FITOQUÍMICAS	20
8.2.1 COMPUESTOS QUÍMICOS	20
8.2.2 FENOLES TOTALES	21
8.2.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIA	22
8.3. ENSAYO BIOLÓGICO	22
8.4. FUNCIÓN RENAL	23
8.4.1 PROTEINURIA	23
8.4.2 DEPURACIÓN DE CREATININA	24
8.5. HIPERTROFIA RENAL	25

8.5.1 RELACIÓN PESO RENAL/PESO CORPORAL TOTAL	25
8.5.2 HISTOLOGÍA	25
8.5.3 Determinación de la expresión de TGF- $\beta$ por Western blot	26
8.6. ANÁLISIS DE DATOS	28
<b>9. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
9.1. EXTRACTO METANÓLICO	28
9.1.1. COMPUESTOS FITOQUÍMICOS	28
9.1.2 FENOLES TOTALES	29
9.1.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIA CA <sub>50</sub>	30
9.2. MODELO DE DM TIPO 1	31
9.2.1 PESO CORPORAL	31
9.2.2 GLUCOSA EN SANGRE	32
9.2.3 PARÁMETROS ALIMENTICIOS EN 24 H	33
9.2.4 VOLUMEN URINARIO	35
9.3. FUNCIÓN RENAL	36
9.3.1 PROTEINURIA	36
9.3.2 DEPURACIÓN DE CREATININA	37
9.4 HIPERTROFIA RENAL	38
9.4.1 RELACIÓN PESO RENAL/PESO CORPORAL	38
9.4.2 HISTOLOGÍA	39
9.4.3 EXPRESIÓN PROTEICA	41
<b>10. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>50</b>

## **Índices de Tablas y Figuras.**

<b>Tabla 1. Clasificación de la diabetes mellitus.</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2 Niveles de glucosa plasmática para el diagnóstico de la DM.</b>	<b>6</b>
<b>Tabla 3 Grupos químicos evaluados en el extracto metanólico de <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> L.</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 4. Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas en el extracto metanólico de <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> L.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 1. Curva estándar de ácido gálico.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 2. Capacidad antioxidante media del extracto.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 3. Peso corporal promedio de los organismos a lo largo del periodo experimental</b>	<b>32</b>
<b>Figura 4. Niveles promedio de glucosa en sangre</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5. Ingesta promedio de alimento en 24 h.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 6. Ingesta promedio de agua de cada grupo en 24 h.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 7. Promedio de la orina producida en 24 h.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 8. Concentración promedio de proteínas en orina cada 24 h.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 9. Ccreatinina eliminada por minuto.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 10. Relación peso renal/peso corporal.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 11. Micrografías (400x) representativas de los cortes histológicos de riñón teñidos mediante la técnica de Hematoxilina – Eosina.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 12. Área celular promedio observada en microscopio óptico40x.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 13. Concentración promedio de la proteína TGF-β.</b>	<b>42</b>

## RESUMEN

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que altera las rutas metabólicas involucradas en la generación de energía intracelular, se caracteriza por niveles altos de glucosa sanguínea en ayuno, causados por la ausencia, déficit, o resistencia a la hormona insulina. El desarrollo de la diabetes puede deberse a muchos factores, ambientales, genéticos, y causados por alteraciones en el metabolismo o por efecto de algunos fármacos. A grandes rasgos la diabetes mellitus se divide en dos clases: tipo 1 (insulinodependiente) y tipo 2 (no insulinodependiente) dependiendo de la cantidad de insulina endógena producida por quien la padece, pero también existen subdivisiones que abarcan procesos específicos en los que se genera como la diabetes gestacional.

La hiperglucemia sostenida provocada por este trastorno causa diversas complicaciones a largo plazo en diferentes órganos del cuerpo como pueden ser la piel, las extremidades, el corazón, el sistema nervioso, los ojos y los riñones. La nefropatía diabética es una complicación renal causada por altos niveles de fibrosis en los riñones, esta se genera a través de múltiples factores generados inicialmente por la hiperglucemia que desencadena una serie de alteraciones en diversos procesos metabólicos. Esta complicación es considerada común al presentarse entre el 30% y el 40% de los pacientes con diabetes tanto tipo 1 como tipo 2 y puede ocasionar muerte por falla renal.

Los tratamientos disponibles están dirigidos principalmente a la inhibición del sistema renina angiotensina, actuando como nefroprotectores, pero se ha comprobado que la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno también tiene un papel determinante en el desarrollo y avance de la enfermedad, causando señalizaciones proinflamatorias y deterioro de la función glomerular.

Existe una gran cantidad de plantas que producen moléculas antioxidantes, potencialmente capaces de evitar el efecto negativo de estas especies reactivas en el organismo, un ejemplo de ellas es *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat., comúnmente conocida como “flor de manita”. Se trata de un árbol utilizado en la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones cardíacas principalmente, con

una actividad antioxidante ya estudiada y comprobada, la cual podría ayudar a evitar o disminuir la progresión de la nefropatía diabética.

Es por esto que en este trabajo se reprodujo un modelo de diabetes mellitus tipo 1 en grupos de ratas Wistar macho durante 6 semanas, las cuales fueron tratadas con dos dosis de extracto metanólico de *C. pentadactylon* (50 mg/Kg y 100mg/Kg), a las cuales se les evaluaron los niveles de glucosa en ayuno, peso corporal, volumen urinario en 24 hrs, ingesta de comida y agua en 24 hrs, función renal e hipertrofia renal, para determinar el estado de las mismas y el efecto del tratamiento sobre la nefropatía diabética en los organismos.

Al utilizar el tratamiento se pudo observar que el extracto no tuvo un efecto en los parámetros del peso corporal y la glucosa en sangre, en cuanto a la cantidad de alimento y agua ingeridos en 24 hrs, el tratamiento de 100 mg/Kg disminuyó la ingesta de alimento y el tratamiento de 50 mg/Kg disminuyó la cantidad de agua ingerida; ambas concentraciones disminuyeron el volumen urinario en comparación con el grupo control diabético.

En cuanto a la función renal, no se observó mejoría en comparación con los controles al administrar el tratamiento en cuanto a proteinuria y depuración de creatinina. Finalmente, en cuanto a la hipertrofia renal, medida por la relación peso renal/peso corporal, el extracto no mostró tener un efecto en este parámetro, pero en cuanto al área celular del túbulo contorneado proximal se encontró una disminución significativa en ambas concentraciones del extracto metanólico, y en el caso de la concentración 50 mg/Kg también se identificó que la producción de TGF- $\beta$  fue significativamente menor en comparación con los grupos control del experimento. Por lo tanto, se afirma que el extracto metanólico de *C. pentadactylon* Larreat logró evitar parcialmente la hipertrofia renal, atribuyendo este efecto a su capacidad antioxidante.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico; en la práctica médica se le denomina así a cualquier trastorno que eleve la glucosa plasmática después del ayuno, quienes lo padecen sufren alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas debido a la ausencia, déficit o resistencia a la hormona insulina, causando la aparición de hiperglucemia persistente en ayunas. Gracias al conocimiento actual de este trastorno, se sabe que existen diversos factores que causan su desarrollo, los cuales pueden ser congénitos, ambientales e inmunológicos; debido a esto se ha generado una clasificación de tipos de DM dependiendo de los factores que se encuentren presentes en cada paciente (Islas y Revilla, 2005). Además de la hiperglucemia existen otros síntomas recurrentes en los pacientes con diabetes, como pueden ser: sed excesiva (polidipsia), visión borrosa, micción frecuente (poliuria), falta de energía o fatiga, hambre constante (polifagia) y pérdida de peso repentina (International Diabetes Federation, 2019).

#### **1.1 Clasificación de la diabetes**

Existen tipos diferentes de DM, dependiendo del origen de la enfermedad y el nivel de afectación metabólica; a gran escala se clasifica en DM tipo 1 (insulinodependientes) y DM tipo 2 (no insulinodependientes), pero también existen casos de diabetes gestacional (durante el embarazo), trastornos de tolerancia a la glucosa, e intolerancia a la glucosa por alteraciones hormonales debido a medicamentos, enfermedades pancreáticas, alteraciones del receptor insulínico, así como otros trastornos genéticos o cromosómicos (Olson, 1986).

La DM tipo 1 es causada por la pérdida de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que provoca que no se secrete insulina, este fenómeno ocurre debido a predisposición genética y la acción de factores ambientales (Secretaría de Salud, 2007). Este tipo de diabetes afecta al 10% de los pacientes del mundo occidental, en estos, se ha encontrado una relación entre la presencia de la enfermedad y antígenos de histocompatibilidad del cromosoma 6; según el equilibrio que guarden la expresión

de estos genes y el ambiente, el daño en las células  $\beta$  pancreáticas es mayor o menor. Entre los factores ambientales se pueden encontrar algunas infecciones virales y agentes químicos que provocan una respuesta autoinmunitaria hacia las células  $\beta$  pancreáticas, lo que causando su eliminación y, por consiguiente, la necesidad de obtener insulina de forma exógena para evitar cetosis espontánea, estado de coma y la muerte (Islas y Revilla, 2005).

En la diabetes mellitus tipo 2, la incidencia es de casi un 90% en los pacientes del mundo occidental, en este caso la relación génica se deriva en una predisposición a desarrollarla cuando hay familiares con esta afectación, y los factores ambientales, así como el estilo de vida, tienen una mayor influencia ya que son compartidos entre los individuos de la familia, causando su desarrollo y evolución entre ellos. En estos casos la obesidad y la resistencia a la insulina son factores importantes y recurrentes en la mayoría de los casos; al corregir el peso y los malos hábitos alimenticios suelen aminorarse los síntomas de la hiperglucemia en ayunas y la resistencia a la insulina, la mayoría de los casos se identifican en la edad madura (Islas y Revilla, 2005).

Las demás clasificaciones específicas de la DM se refieren a situaciones en las que el cuerpo sufre alteraciones o síndromes que provocan el desarrollo de los signos de la DM; a continuación, se mencionan los casos correspondientes:

Clasificación	Especificaciones
1. Tipo 1* (Destrucción de células $\beta$ que conduce a una deficiencia absoluta de insulina)	A. Mediada por mecanismos inmunológicos B. Idiopática
2. Tipo 2* (Con variaciones desde la resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa de insulina al defecto en la secreción predominante con resistencia a la insulina)	
3. Otros: A) Defectos genéticos de la función de la célula $\beta$ en:	1. Cromosoma 12, HNF-1 $\alpha$ (MODY 3) 2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY 2) 3. Cromosoma 20, HNF-4 $\alpha$ (MODY 1) 4. Ácido desoxirribonucleico mitocondrial 5. Otras
B. Defectos genéticos en la acción de la insulina	1. Resistencia a la insulina tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabetes lipoatrófica 5. Otras
C. Enfermedades del páncreas exocrino	1. Pancreatitis 2. Traumatismo/pancreatectomía 3. Neoplasia 4. Fibrosis quística 5. Hemocromatosis 6. Pancreatopatía fibrocalculosa 7. Otras
D. Endocrinopatías	1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Feocromocitoma 5. Hipertiroidismo 6. Somatostatina 7. Aldosteronoma 8. Otras
E. Sustancias químicas o fármacos capaces de inducir diabetes	1. Pentamidina 2. Ácido nicotínico 3. Glucocorticoides 4. Hormona tiroidea 5. Diazóxido 6. Agonistas adrenérgicos $\beta$ 7. Tiacidas 8. Difenilhidantoína 9. Interferón $\alpha$ 10. Otras
F. Infecciones	1. Rubéola congénita 2. Citomegalovirus 3. Otras
G. Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente	1. "Síndrome del hombro rígido" 2. Anticuerpos contra el receptor de insulina 3. Otras
H. Otros síndromes que algunas veces se acompañan de diabetes	1. Síndrome de Down 2. Síndrome de Klinefelter 3. Síndrome de Turner 4. Síndrome de Wólfra 5. Ataxia de Friedreich 6. Corea de Huntington 7. Síndrome de Lawrence-Moon-Beidel 8. Distrofia miotónica 9. Porfiria 10. Síndrome de Prader-Willi 11. Otras.
4. Diabetes mellitus gestacional	Intolerancia a los carbohidratos durante el embarazo, puede o no requerir insulina y puede persistir o desaparecer tras resolverse el embarazo.

**Tabla 1. Clasificación de la diabetes mellitus (tomada y modificada de Comité de expertos de la American Diabetes Association, 1997. El símbolo \* se refiere a que el paciente con este tipo de diabetes puede requerir insulina en algún momento).**

## 1.2 Diagnóstico de la diabetes mellitus

Los protocolos clínicos actuales estipulan que, para realizar el diagnóstico de diabetes, prediabetes y resistencia a la insulina, es necesario verificar los niveles de glucosa en sangre en ayunas y 2 h después de ingerir 75 mg de glucosa anhidra, para observar alguno de los siguientes parámetros (Islas y Revilla, 2005; Secretaria de Salud, 2007):

Categoría	Prueba	
	Glucosa plasmática en ayuno	Glucosa a las 2 h
Normal (normoglucémico)	<100 mg/100 mL (<5.6 mmol/L)	<140 mg/100 mL (<7.8 mmol/L)
Intolerancia a la glucosa en ayunas	100 a 125 mg/100 mL (5.6 a 6.9 mmol/L)	—
Intolerancia a la glucosa	—	140 a 199 mg/mL (7.8 a 11 mmol/L)
Prediabetes	≤100 mg/100 mL y ≥125 mg/100 mL	≤140 mg/100 mL y ≥199 mg/100 mL
Diabetes*	≥126 mg/100 mL (≥7.0 mmol/L)	≥200 mg/100 mL (≥11.1 mmol/L)

**Tabla 2 Niveles de glucosa plasmática para el diagnóstico de la DM (Islas y Revilla, 2005; Secretaria de Salud, 2007).**

## 1.3 Epidemiología de la DM

La DM es una enfermedad padecida por alrededor de 500 millones de personas en el mundo; solamente en Norteamérica y el Caribe se calculó alrededor de 48 millones de personas con esta enfermedad en el año 2019, estimándose que en el año 2045 serán alrededor de 63 millones, lo que representaría un aumento de alrededor de 33% en un lapso de 26 años. En el año 2019 en México, se estimó que en la población adulta de entre 20 y 79 años de edad existen alrededor de 12,805,000 personas con diabetes, de las cuales alrededor de 4,949,000 desconocen de su condición, y en menores de entre 1 y 19 años alrededor de 26,578 padecen DM tipo 1; esto convierte a México en el segundo país con la mayor incidencia de DM en la población adulta, superado solo por Estados Unidos (International Diabetes Federation, 2019).

## 1.4 Complicaciones de la DM

La hiperglucemia genera daño a largo plazo, el cual se manifiesta como complicaciones en el organismo de la persona afectada, estas complicaciones pueden clasificarse como macroangiopatías y microangiopatías; se generan en el

organismo al alterar el endotelio vascular por diferentes factores como: cambios cuantitativos y cualitativos a nivel de membrana, aumento en la glicosilación no enzimática, deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio, incremento del estrés oxidativo y autooxidación de la glucosa, y aumento de la vía de los polioles (Triana y col., 2010).

Las macroangiopatías se caracterizan por afectar a arterias medias y grandes, manifestándose principalmente como arteriosclerosis, lo cual puede dañar al aparato cardiovascular en general, aumentando el riesgo de infarto, accidente cerebrovascular y gangrena en extremidades inferiores. En cambio, las microangiopatías se refieren al daño causado en arteriolas y capilares que deriva en disfunción y falla de diversos órganos, como son: ojos (retinopatía), riñones (nefropatía) y sistema nervioso periférico (neuropatía) (Secretaria de Salud, 2007) (Pereira y col., 2015).

## **2. Nefropatía diabética**

Una de las complicaciones generadas a través de las microangiopatías es la nefropatía diabética (ND); la cual es una complicación frecuente en los pacientes con diabetes de tipo 1 y tipo 2, se calcula que afecta entre el 30% y el 40% de los diabéticos adultos, pero es más común en los pacientes del tipo 1, en estos la incidencia de esta complicación va de entre el 50 y el 60% de los pacientes, en el caso de México se estima que por cada 100,000 habitantes 1.24 padecen ND (Bárcena y Colchero, 1999).

Durante la progresión de la ND existen diferentes síntomas y cambios anatómicos y funcionales que causan el deterioro de la función renal; entre estos cambios se pueden mencionar el aumento de la matriz mesangial y el engrosamiento de la membrana basal glomerular, siendo estos síntomas causados por la hiperglucemia y que marcan el inicio del daño renal, pero sus efectos no son detectables con análisis convencionales al inicio de la enfermedad. Con el paso del tiempo los efectos van aumentando, apareciendo también glomeruloesclerosis capilar difusa en la cual se obstruyen progresivamente los capilares glomerulares, así como glomeruloesclerosis nodular con la presencia de nódulos hialinos en asas periféricas del ovillo glomerular, este tipo de lesiones nodulares son comunes en los casos de ND. También se desarrollan lesiones tubulares (vacuolización vascular, dilatación, y lesiones de Armani-Ebstein, gotas de glicógeno en células tubulares del túbulo contorneado proximal, que aparecen como resultado del desorden metabólico), vasculares (hialinización de arteriolas aferentes y/o eferentes), e intersticiales (infiltrado inflamatorio crónico, edema y fibrosis intersticial) (Bárcena y Colchero, 1999). En la mayoría de estos casos se produce insuficiencia renal terminal, siendo esta una de las principales causas de muertes en países en desarrollo (Ugarte y Carranza, 2002).

## 2.1 Fases de la ND

Según Mogensen y col. (1983) la ND consta de 5 etapas:

1. En la primera se puede apreciar un aumento de volumen renal e hiperfiltración (aumento en la velocidad de filtración glomerular de 20 a 40%), en este momento la afección es reversible con un tratamiento insólito estricto y los niveles de creatinina plasmática son normales al igual que la presión arterial.
2. Durante la segunda etapa se puede apreciar un engrosamiento de la membrana basal del glomérulo y expansión de la matriz mesangial, esto ocurre alrededor de dos años después del diagnóstico de la DM, aun es reversible el avance en esta etapa, la creatinina plasmática y la presión arterial siguen siendo normales, pero se presenta una ligera albuminuria menor a 20  $\mu\text{g}/\text{min}$ .
3. El tercer estadio se genera entre 5 y 10 años después del diagnóstico de DM, se detecta al encontrarse una concentración entre 20 y 200  $\text{mg}/\text{min}$  de albúmina en al menos tres muestras de orina en seis meses (microalbuminuria), junto con hipertensión arterial, aumento de hemoglobina glicosilada, y aparición de otras complicaciones como anemia, alteración del metabolismo del calcio/fósforo, retinopatía, dislipidemia, etc.; en esta etapa se puede detectar la ND por estudios específicos y es probablemente reversible.
4. Durante la cuarta etapa, después de más de diez años con DM, aparece la proteinuria superior a 200  $\mu\text{g}/\text{min}$  o de 300  $\text{mg}/24 \text{ h}$  (macroalbuminuria), sin tener una infección urinaria, fácilmente detectable con análisis generales de orina, se genera una disminución de la velocidad de filtración glomerular progresiva y un aumento de la creatinina plasmática. En el microscopio se pueden detectar hialinosis arteriolar, glomeruloesclerosis, lesiones tubulointersticiales y vasculares. En este punto el daño es irreversible y progresivo.
5. En la última etapa se desarrolla la insuficiencia renal terminal, la velocidad de filtración glomerular es menor a 10  $\text{mL}/\text{min}$ , hay hipertensión arterial, el

tamaño de los riñones disminuye, uremia, y oclusión glomerular total, es necesario recurrir a diálisis o trasplante renal para evitar la muerte del paciente.

## **2.2 Desarrollo de la ND**

Existen diversos factores para el desarrollo de la ND, como lo son la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la autooxidación de la glucosa, la formación de productos de glucosilación avanzados (AGE), la vía de los polioles y la vía de las hexosaminas.

## **2.3 Radicales libres y estrés oxidativo**

Los radicales libres se producen en el organismo de manera natural durante la respiración celular y la glucólisis, ya que el metabolismo de la glucosa hace uso de reacciones de oxidación para producir la energía que requiere el organismo. La hiperglucemia aumenta la generación de ERO a través de diferentes mecanismos, como el incremento de la actividad mitocondrial por la cantidad de piruvato y acetil-CoA producidos durante el metabolismo de la glucosa, los cuales saturan la vía del ciclo de Krebs y, posteriormente, la cadena transportadora de electrones mitocondrial; esto provoca que la reducción del oxígeno no sea siempre efectiva y este al ser reducido parcialmente genere ERO como el ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Calderón y col., 2013; Green y col., 2004).

Las ERO suelen tener como blanco a los lípidos de las membranas plasmáticas de células renales, así como en la retina y las células del sistema nervioso periférico, peroxidándolas y alterando su función. El estrés oxidativo también puede afectar la función glomerular al dañar las células mesangiales y endoteliales glomerulares; de igual manera causa la activación de genes mediadores inflamatorios en las células del epitelio tubular renal, que promueven el reclutamiento de leucocitos y macrófagos a este nivel, los cuales aumentan el daño previo (Hernández y col., 2011).

## **2.4 Autooxidación de la glucosa y productos de glucosilación avanzada**

### **(AGE)**

La glucosa tiene la cualidad de autooxidarse al encontrarse en altas concentraciones en la célula, creando un enediol, que en presencia de metales de transición como el  $\text{Fe}^{+3}$  reacciona con oxígeno ( $\text{O}_2$ ) y una proteína, formando proteínas glucosiladas conocidas como productos de glucosilación avanzada (AGE), los cuales, son capaces de producir oxidaciones en cadena con otras proteínas causando daños estructurales y funcionales en las células. La oxidación de productos intermedarios en la generación de AGE también causa la formación  $\text{O}_2^-$ , que es metabolizado por la enzima superóxido dismutasa y transformado en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual reacciona también con metales de transición aumentando la producción del ion hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) (Yamagishi, 2010; Calderón y col., 2013).

De igual forma el aumento de la glucólisis en las células bajo esta condición hace que se puedan formar intermediarios que reaccionen fácilmente con proteínas formando más AGE, como el glioxal y la 3-desoxiglucosa; también existe la acumulación de glicerol-3-fosfato que al encontrarse en altas concentraciones funciona como segundo mensajero activando a la proteína cinasa C (PKC) y la actividad de la NADPH oxidasa que reduce parcialmente al oxígeno y produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  que reacciona fácilmente con proteínas y lípidos (Das y King, 2007; Calderón y col., 2013).

## **2.5 Vía de los polioles o del sorbitol**

La hiperglucemia puede activar vías alternas en células no insulino dependientes como la vía del sorbitol o de los polioles, en la cual se utiliza a la enzima aldosa reductasa para metabolizar la glucosa en sorbitol y posteriormente en fructosa-6-fosfato, pero con el aumento de sorbitol intracelular se da un incremento en la osmolaridad, por lo cual, las células tienden a absorber agua causando edema, y de manera paralela la enzima aldosa reductasa requiere de equivalentes reductores

(NADPH) para poder realizar esta función; por lo tanto existe una descompensación de equivalentes, lo cual disminuye la capacidad antioxidante endógena al inhibir la función de la glutatión hidrogenasa, la cual es dependiente de NADPH, aumentando las concentraciones de ERO intracelulares (Ugarte y Carranza, 2002; Calderón y col., 2013).

## **2.6 Vía de las hexosaminas**

Como consecuencia del exceso de glucosa procesada en la glucólisis y también en vías alternas como la de los polioles, existe un aumento en la cantidad de fructosa-6-fosfato intracelular, así como de gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato; estos últimos son compuestos reactivos que pueden contribuir a la formación de AGE y  $O_2^-$  al encontrarse en altas concentraciones. En cuanto a la fructosa como tal, en exceso, puede estimular la activación de la vía de las hexosaminas al encontrarse un exceso de  $O_2^-$  en la célula, formándose glucosamina-6-fosfato. La activación de esta vía se relaciona con la estimulación en la transcripción de genes que codifican factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ), el cual participa también en el desarrollo de la ND tanto por esta vía como por su expresión mediada por el sistema renina-angiotensina (Díaz, 2006).

## **2.7 Sistema renina-angiotensina**

El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA) es una cascada proteolítica que se une a un sistema de transducción de señales a través de los receptores de angiotensina tipo 1 y 2 ( $AT_1$  y  $AT_2$ ). Para generar el efecto de esta vía se requiere de la activación de varias enzimas; en primer lugar, debe formarse la angiotensina I, a través de la acción de la renina en el angiotensinógeno. La renina se encuentra principalmente en el riñón donde es convertida en renina a partir de la prorenina, y el angiotensinógeno se produce principalmente en el hígado, pero también se expresa en zonas como el cerebro, tejido adiposo, arterias grandes, corazón y el riñón. Posteriormente, la angiotensina I, al ser un decapeptido inactivo, debe ser

activada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual elimina una fracción de la angiotensina I, convirtiéndola en angiotensina II (un octapéptido bioactivo) (Santeliz y col., 2008).

La angiotensina II es la molécula efectora del SRA, al entrar en contacto con el receptor AT<sub>1</sub>, en el riñón, produce vasoconstricción de la arteria renal, reabsorción de Na<sup>+</sup> en el túbulo epitelial, reabsorción de agua y contracción de células mesangiales disminuyendo el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (Ortega-Pierre y col., 2007), cuando existe estrés oxidativo se produce hipertensión glomerular, este efecto depende de la aparición del ion superóxido, el cual proviene de la oxidasa de NADPH (Landmesser y col., 2002).

En los pacientes con diabetes, la activación del receptor AT<sub>1</sub> también produce una mayor producción de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , debido inicialmente a las altas concentraciones de glucosa intracelular y a una expresión aumentada de protooncogenes que regulan la transcripción de genes comprometidos en el crecimiento celular. En el tejido renal, debido a la hipertensión provocada por el efecto constante del receptor AT<sub>1</sub>, se genera un deterioro en los poros de la membrana basal glomerular; debido a esto muchos pierden su selectividad y se produce la albuminuria, esto provoca efectos tóxicos en los túbulos y apoptosis en el epitelio, así como la producción de moléculas proinflamatorias que atraen monocitos y linfocitos T. La albúmina también aumenta la producción de TGF- $\beta$ , y hace que las células de los túbulos sean más sensibles a éste, incrementando sus efectos, contribuyendo a la fibrosis renal al tratar de reparar el tejido renal dañado, tanto por los efectos apoptóticos de la albuminuria como por los monocitos y linfocitos T al entrar al tejido, aumentando la producción de colágena, fibronectina y tenascina, causando así el deterioro progresivo del riñón (Topete-Reyes, 2015).

### **3. Antioxidantes en la ND**

Actualmente, el tratamiento de la ND está dirigido a mantener un control metabólico estable y el manejo adecuado de la presión arterial, utilizando antihipertensivos nefroprotectores, como inhibidores y bloqueadores del sistema renina angiotensina, pero a pesar de conocerse el papel que juegan las ERO en la ND, el uso de antioxidantes no ha tenido una participación destacada para su prevención y tratamiento (Mora y col., 2009).

Una alternativa para la obtención de nuevos fármacos para tratar la ND es la experimentación con compuestos fitoquímicos; se ha comprobado que existen diversas plantas que tienen actividades favorables utilizadas en el control y prevención de la diabetes debido a sus componentes antioxidantes, como son los compuestos fenólicos. Existe una amplia diversidad de compuestos fenólicos producidos por organismos vegetales (Rivas y col., 2015); un ejemplo de esto es el resveratrol, el cual se encuentra en las uvas, moras y cacahuates, así como en productos procesados como el vino tinto. Este compuesto posee una amplia variedad de efectos bioactivos, de los cuales se puede destacar el efecto antioxidante, el cual inactiva las especies reactivas de oxígeno al estabilizarlas donándoles electrones (Albertoni y Schir, 2014).

#### 4. Uso de plantas antioxidantes en la DM

Desde hace muchos años, el uso de plantas para controlar las afecciones provocadas por la DM es conocido en la medicina tradicional alrededor del mundo, ya sea a través de tratamientos realizados directamente con los elementos de las plantas conocidas, o por productos procesados obtenidos de estas. En 2003 se estimó que existían alrededor de 400 productos en el mercado para el control de la DM con el fin principal de tener un mayor control de los niveles de glucosa en la sangre de los pacientes (Yeh y col., 2003).

México, al ser un país con una gran diversidad vegetal, también presenta casos de plantas usadas para tratar esta afección. Esquivel-Gutiérrez y col. (2012) mencionan las principales familias vegetales a las que pertenecen las plantas más utilizadas en el tratamiento de la DM mundialmente: Fabaceae, Asteraceae, Lambiaceae, Liliaceae, Poaceae, Euphorbiaceae, entre otras. Y mencionan las principales plantas usadas en la herbolaria mexicana para esta enfermedad: gordolobo (*Gnaphalium sp.*), eucalipto (*Eucaliptus globulus*), hierbabuena (*Menta sp.*), manzanilla (*Matricaria Chamomilla*), nopal (*Opuntia ficus-indica*), verbena (*Verbena carolinica*), árnica (*Meterotheca spp.*), guarumbo (*Cecropia obtusifolia*), sauco amarillo (*Tecoma stans*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), sábila (*Aloe vera*), ruda (*Ruta graveolens*), romero (*Rosmarinus officinalis*), etc.

De igual manera mencionan una especie de la familia Malvaceae, *Guazuma ullmifolia*, conocida comúnmente como Guásimo o Guásima, la cual corresponde a un árbol utilizado en la medicina tradicional en países como Indonesia y México, donde se realizan infusiones con sus hojas y corteza (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Prahastuti y col. (2009) demostraron que el extracto de *G. ullmifolia* disminuye los niveles de glucosa, fibronectina, TGF- $\beta$ , y ERO intracelulares en una línea celular de células mesangiales de ratón, lo cual podría evitar la progresión de complicaciones renales como la ND, atribuyendo este efecto a la capacidad antioxidante de sus metabolitos secundarios (ácido clorogénico, flavonoides, quercetina y glucósidos de quercetina).

Así mismo, *C. pentadactylon*, mejor conocida como “flor de manita”, es un árbol perteneciente a la familia Malvaceae, tiene una altura de entre 10 y 40 m, con hojas grandes lobuladas, amarillentas y pálidas en el envés con terminación en punta, que produce flores solitarias de color rojizo, cada árbol produce varios cientos de flores distribuidas en las partes bajas del árbol (Toledo, 1975; Brocca y Tovar, 2000).

La flor tiene forma de copa, carece de pétalos, está formada por un cáliz dividido en cinco partes carnosas de color rojo intenso en la parte interior y café rojizo en la exterior, cinco estambres fusionados en la base que forma una columna asemejando una mano extendida de un color rojo intenso y están formados por dos anteras que contienen abundante polen, pistilo en la parte posterior de los estambres con cinco pequeñas extensiones estigmáticas y cinco cavidades nectarinas que producen abundante néctar (Toledo, 1975; Brocca y Tovar, 2000).

Las características de las flores de *C. pentadactylon* permiten su polinización al facilitar el acercamiento de aves percheras, principalmente nectívoras, las flores se encuentran en los bordes de las ramas que funcionan como percha para las aves mientras estas se alimentan del néctar impregnando el polen en sus cabezas y frente dispersándolo y polinizando otras flores que visite el ave. Algunos ejemplos de aves que se alimentan de esta planta son: *Icterus* sp, *Setophaga picta*, *Dendroica* sp, *Ptylogonys cinereus*, *Hylocharis leucotis*, *Colibri thalassinus* (Toledo, 1975).

*C. pentadactylon* se distribuye desde la zona centro y sur de México hasta Colombia, en alturas de entre 1700 y 2500 metros sobre el nivel del mar, habita generalmente en climas cálidos semicálidos y templados. En nuestro país se encuentra en estados como Estado de México, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Guanajuato, Chiapas y Puebla en bosques caducifolios y bosques de pino-encino, ocasionalmente forma bosques en montañas o en selvas y suele florecer del mes de febrero a mayo, pero algunos árboles cultivados florecen entre junio y diciembre, o a finales del otoño y principios del invierno (Toledo, 1975; Brocca y Tovar, 2000).

Bye y Linares (1983) reportaron a *C. pentadactylon* en un estudio etnobotánico de las plantas encontradas en mercados mexicanos como una especie con utilidad para tratar afecciones cardíacas, las flores son utilizadas ya sea solas o en conjunto

con otras plantas como la magnolia, tila, toronjil, hinojo, hierbabuena y flor de azahar, principalmente en infusiones utilizadas como agua de uso, y se sabe de su utilización desde la época prehispánica (Brocca y Tovar, 2000).

Existen estudios que han probado el efecto antioxidante de extractos de *C. pentadactylon* así como su efectividad contra afecciones de diferentes ámbitos, como la diarrea provocada por toxinas de bacterias como *E. coli* o *V. cholerae*, la parasitosis de protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, y su efecto vasoactivo. En los cuales se mencionan principalmente a los compuestos fenólicos como posibles principios activos para generar estos efectos, mencionando algunos como la epicatequina y el tilirosido, y mostrando en todos los casos resultados favorables tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* (Perusquia y col., 1995; Calzada y col., 2006; Velázquez y col., 2012; Villa-Ruano y col., 2013; Calzada y col., 2017).

## 5. JUSTIFICACIÓN

La DM es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial, es padecida por millones de adultos en México, con una alta tasa de mortalidad relacionada con las complicaciones que esta enfermedad conlleva, como la ND; esta llega a afectar alrededor del 50% de las personas que padecen DM, por lo cual la búsqueda de fármacos y tratamientos novedosos para su control es necesaria. Una posible respuesta a esta necesidad puede ser la utilización de compuestos naturales con actividad antioxidante, ya que se sabe que el desarrollo de esta complicación es generado en gran parte por factores del estrés oxidativo, por lo tanto, plantas como *C. pentadactylon*, cuya actividad antioxidante ha sido comprobada previamente, pueden contener compuestos que ayuden a combatir la condición prooxidante en los pacientes con DM y retardar el desarrollo de la ND.

## 6. HIPÓTESIS

Ya que el estrés oxidativo es un factor determinante en el desarrollo de la nefropatía diabética, la actividad antioxidante del extracto metanólico de *C. pentadactylon* podría ser útil en el tratamiento o prevención de la de la nefropatía diabética en ratas con diabetes mellitus experimental, evitando o ralentizando su desarrollo.

## 7. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Estudiar el efecto del extracto metanólico de la flor de manita (*C. pentadactylon*) sobre la nefropatía diabética en ratas con diabetes mellitus experimental.

### Objetivos particulares

- Evaluar la función renal, a través de la proteinuria y depuración de creatinina en ratas diabéticas tratadas con el extracto metanólico de *C. pentadactylon*.
- Determinar la hipertrofia renal mediante la relación peso renal/peso corporal y la medición del área de las células del túbulo contorneado proximal en cortes histológicos de la corteza renal de las ratas diabéticas tratadas con extracto metanólico de *C. pentadactylon*.
- Determinar la expresión de la proteína TGF- $\beta$ 1 en la corteza renal de ratas diabéticas tratadas con el extracto metanólico de *C. pentadactylon*.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Obtención del extracto metanólico

Se obtuvieron 320 g de flores deshidratadas de *C. pentadactylon* en el Mercado de Zumpango, Estado de México, con un productor que proporcionó una muestra vegetal, la cual fue prensada para su determinación en el herbario IZTA. Las flores fueron pulverizadas y sometidas a extracción exhaustiva por soxhlet en dos pasos, el primero con hexano para eliminar lípidos, y el segundo con metanol para obtener el extracto a utilizar en el tratamiento; este fue posteriormente concentrado en rotaevaporador a 55°C para eliminar el metanol.

### 8.2. Pruebas fitoquímicas

Se realizaron pruebas de análisis fitoquímico para determinar las propiedades antioxidantes del mismo, así como pruebas cualitativas para identificar el contenido de alcaloides, saponinas, fenoles, coumarinas y lactonas en el extracto de *C. pentadactylon* (Dey y Harbone, 1989).

#### 8.2.1 Compuestos químicos

Los grupos químicos presentes en el extracto metanólico de *C. pentadactylon* fueron identificados a través de pruebas específicas para cada grupo:

Saponinas	Presencia de espuma
Fenoles	FeCl <sub>3</sub>
Alcaloides	Dragendorff
Coumarinas	NH <sub>4</sub> OH
Lactonas	Hidroximato férrico

**Tabla 3 Grupos químicos evaluados en el extracto metanólico de *C. pentadactylon* L. con la prueba o reactivo utilizados para su identificación.**

Saponinas: Prueba de altura y estabilidad de espuma. En un tubo de ensaye se colocó 1 mL del extracto, se agitó vigorosamente y se midió la altura de la espuma, considerando la prueba positiva si esta alcanzaba una altura de entre 8 y 10 mm y se mantenía por 30 min.

Fenoles: A 1 mL del extracto se le agregaron 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 2%, se calentó a ebulición por un minuto, se enfrió y filtró, posteriormente se agregó una gota de cloruro férrico al 1%, la formación de coloraciones de azul a negro indica una presencia de derivados del ácido gálico; y las coloraciones verdes, de derivados del catecol.

Alcaloides: Se tomó una porción del extracto y se le agregaron 5 mL de ácido clorhídrico al 10%, se calentó a ebulición por 5 min, se enfrió y se filtró. Se adicionó una gota de reactivo de Dragendorff, la prueba se consideró positiva si se formó un precipitado naranja.

Coumarinas: Se concentró una porción del extracto y se le adicionaron 0.5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se consideró positiva la prueba si se presentó una fluorescencia azul.

Lactonas: Se agregó una porción del extracto a una cápsula de porcelana, se le adicionaron dos gotas de clorhidrato de hidroxilamina 2 N y una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Se calentó la mezcla a ebulición durante 2 min, se enfrió y ajustó el pH 1 con ácido clorhídrico 0.5 N. Se agregó una gota de cloruro férrico 1%; si la coloración es roja, violeta o rosa, la prueba es positiva.

### **8.2.2 Fenoles totales**

También se cuantificó la cantidad de fenoles totales utilizando la técnica del reactivo de Folin-Ciocalteu, mediante una curva de calibración con ácido gálico (0-120 µg/mL), para identificar la concentración del extracto a través de una reacción colorimétrica evaluada por espectrofotometría, con la absorbancia obtenida a 760 nm (en las mismas concentraciones) interpolando el valor obtenido al diluir el extracto con la curva patrón generada (Singleton y Rossi, 1965).

### 8.2.3 Capacidad antioxidante media

La capacidad antioxidante media del extracto se evaluó a través de la técnica del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), utilizando una curva estándar de quercetina como control, se diluyó el extracto y la quercetina con metanol para generar soluciones stock, con las cuales se realizaron reacciones en placas de 96 pozos con 150  $\mu$ L de DPPH y se cubrió la placa con papel aluminio, después de 30 min de reacción se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 517 nm, generando dos curvas, una estándar de quercetina (0-15  $\mu$ g/mL) y otra del extracto metanólico (0-50  $\mu$ g/mL); con los valores de absorbancia obtenidos se calculó el porcentaje de decoloración con la siguiente fórmula:  $((\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra})/\text{Abs blanco}) * 100$ , y finalmente usando la ecuación de la curva se calculó la concentración antioxidante media del extracto ( $CA_{50}$ ) (Palomo y col., 2009).

### 8.3. Ensayo biológico

Para evaluar el efecto del extracto, se formaron al azar 5 grupos de ratas Wistar, machos (control, control diabético (DM), 50 mg/kg de extracto metanólico (EM50 mg), 100 mg/kg (EM100 mg) y 65 mg/Kg de captopril (Cap), con un peso corporal entre 230 y 250 g, las cuales fueron obtenidas en el Bioterio de la FES Iztacala, UNAM; se alimentaron con agua y alimento *ad libitum*, y tuvieron ciclos de luz/oscuridad de 12 h por igual. Cinco días después, se cuantificó su glucosa en sangre tras un ayuno de 8 h con un glucómetro de marca Accu-check y a los grupos DM, EM50 mg, EM100 mg y Cap se les administró una dosis única de estreptozotocina (STZ) 65 mg/kg, vía intraperitoneal, disuelta en un buffer de citrato 10 mM, pH 4.5, para inducir la diabetes mellitus, al grupo control solo se le administró el buffer de citratos como control. Se cuantificó de nuevo la glucosa en sangre 48 h después a la aplicación de STZ y se consideraron diabéticas a las ratas que presentaron una glucemia  $\geq 300$  mg/dL (Amato, y col., 2016). Los tratamientos se administraron diariamente, por vía oral, durante 6 semanas, diluidos en propilenglicol, con ayuda de una cánula gastroesofágica; se pesaron a los

organismos 3 veces a la semana (lunes, miércoles y viernes) y se les midió la glucemia en sangre una vez por semana.

Un día previo a terminar el periodo del tratamiento, se cuantificó el consumo de agua y alimento, así como el volumen de orina en 24 h. Para este fin, los organismos se colocaron en jaulas metabólicas, y también se colectó su orina para evaluar la proteinuria y la depuración de creatinina. Al concluir el tratamiento los organismos se anestesiaron con pentobarbital sódico (45 mg/kg, vía intraperitoneal), para realizar una incisión en el abdomen y poder extraer los riñones, y una muestra de 3 mL de sangre de la aorta abdominal en un tubo de ensaye con citrato de sodio 3.2% (1:10) como anticoagulante, para finalmente sacrificarlos. Ambos riñones fueron decapsulados, el riñón derecho fue pesado y se le separó la corteza de la médula, y posteriormente fue preservado en refrigeración a -80°C. El riñón izquierdo fue seccionado primero con un corte sagital, y una de las mitades se dividió en 3 partes que fueron fijadas en una solución de para-formaldehído al 4% con buffer PBS, pH 7.4; las muestras se mantuvieron de esta manera hasta su posterior utilización. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min para obtener el plasma que fue guardado en alícuotas etiquetadas para su posterior utilización. Estos procesos fueron realizados bajo lo establecido en la norma de Regulación Federal Mexicana NOM-062-ZOO-2001 para el cuidado y la experimentación en animales de laboratorio.

#### **8.4. Función renal**

Para determinar el estado del funcionamiento de los riñones de las ratas se evaluaron parámetros como la proteinuria y la depuración de creatinina.

##### **8.4.1 Proteinuria**

Se evaluó la proteinuria de 24 h con el método de Bradford (1976), con la orina colectada en las cajas metabólicas, en placas de 96 pozos. Se colocó una muestra de 5 µL de orina en cada pozo (las muestras del grupo control fueron previamente

diluidas 1:10) junto con 155  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford por duplicado, después de agitar se valoró la absorbancia obtenida a 570 nm comparándola con una curva de calibración con una concentración conocida de albúmina entre 0 y 100  $\mu\text{g}$ , y se realizaron los cálculos pertinentes para conocer la concentración de proteínas eliminadas por la orina durante 24 h para cada tratamiento (mg/24 h).

#### **8.4.2 Depuración de creatinina**

Para la estimación de la depuración de creatinina, se midió la concentración existente de la molécula en el plasma y la orina de las ratas por el método cinético colorimétrico de tiempo fijo (Jaffé, 1886), con el uso de un kit comercial de la marca Cayman Chemical (ítem No. 500701).

En placas de 96 pozos por duplicado, se prepararon las muestras con 15  $\mu\text{L}$  de orina (las muestras del grupo control fueron diluidas 1:10) con 150  $\mu\text{L}$  de solución de picrato alcalino; la placa fue agitada durante 10 min y se midió la absorbancia a 490 nm, con una curva de calibración realizada con una concentración conocida de creatinina (0-15 mg/dL), posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una mezcla de ácidos acético y sulfúrico, se volvió a agitar durante 15 min, y se midió la absorbancia de las muestras a 490 nm. Después se restó el valor de la absorbancia final al de la inicial para obtener la absorbancia corregida y se realizaron los cálculos para conocer la concentración de creatinina en la orina.

Para conocer la concentración de creatinina en plasma, se utilizaron 15  $\mu\text{L}$  de plasma con 100  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción y 100  $\mu\text{L}$  de ácido pícrico, después de un minuto se midió la absorbancia a 490 nm, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 7 min y se volvió a medir la absorbancia a 490 nm, las mediciones fueron contrastadas con una curva estándar de creatinina (0-15 mg/dL) y se realizó el cálculo para conocer la concentración de creatinina en plasma. Finalmente se calculó la depuración de creatinina por minuto (mL/min).

## **8.5. Hipertrofia renal**

La determinación del daño en las nefronas se evaluó por la relación del peso del riñón derecho con el peso corporal total y la realización de cortes histológicos teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina para medir el área de células del túbulo contorneado proximal (Vázquez y col., 2018).

### **8.5.1 Relación peso renal/peso corporal total**

Para obtener este valor, se realizó el cociente del peso del riñón derecho recién extraído y decapsulado entre el peso corporal total de la rata el día en que se sacrificó. El riñón fue pesado usando una balanza analítica y el peso corporal de la rata se obtuvo con una balanza para animales (Vázquez y col., 2018).

### **8.5.2 Histología**

Los tejidos previamente fijados en para-formaldehído al 4 % en PBS, fueron retirados de éste al día siguiente, y posteriormente fueron deshidratados con un tren de alcoholes de concentraciones ascendentes (agua, alcohol 70 %, 80 %, 90 %, absoluto) con periodos de una hora en cada uno; posteriormente se aclararon con una aplicación de xilol por una hora, después los riñones fueron colocados en frascos de vidrio con parafina previamente derretida a 60°C (parafina I); la parafina fue cambiada después de una hora (parafina II) para eliminar el exceso de xilol, y finalmente fueron colocados en moldes de inclusión rápidamente con parafina nueva derretida.

De los cubos obtenidos se obtuvieron cortes de 7 µm con un microtomo, que fueron extendidos en portaobjetos y se les agregaron gotas de líquido de Ruyter como adherente, luego fueron colocados en una placa de calentamiento a 57°C para estirar el tejido con ayuda de un pincel, y se dejaron enfriar.

Los cortes fueron colocados en un horno a 57°C durante 2 h mínimo, para eliminar los residuos de parafina antes de ser teñidos con Hematoxilina y Eosina, con un tren

de alcoholes ascendentes; posteriormente fueron montados con el uso de resina Entellan y un cubreobjetos y se dejaron secar por 24 h. Finalmente, para observar el área de las células del tubo proximal se utilizó un microscopio óptico, se tomaron fotomicrografías y se evaluó el resultado con el software Motic Image plus 3.0ML (Díaz, 2015).

### **8.5.3 Determinación de la expresión de TGF- $\beta$ por Western blot**

Con una muestra de 100 mg del tejido de corteza renal almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se realizó un homogeneizado con 1 mL de solución Tris HCl 0.1 M, pH 7.4, junto con una mezcla de inhibidores de proteasas (pastillas Mini complete, Roche), el cual fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 min, se recuperaron cuatro alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, una para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976), y tres para determinar la expresión de la proteína TGF- $\beta$ 1 por inmunoblot; a estas se les agregó buffer Laemli (buffer de carga) con  $\beta$ -mercaptoetanol al 10 %, se colocaron en un baño de agua hirviendo por 10 min y se almacenaron en congelación hasta su utilización.

Con las alícuotas listas se separaron las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % junto con un marcador de peso molecular Bio-Rad, en muestras de 100  $\mu\text{g}$  de proteína. Se preparó el gel de poliacrilamida al 10 % con SDS para la separación de las proteínas, se colocó en una cámara de electroforesis marca BioRad con buffer de corrida 1X y se colocó una guía para agregar las muestras (de 100  $\mu\text{g}$  de proteínas) y las proteínas marcadoras de peso molecular BioRad (5  $\mu\text{L}$ ), preteñidas, con una micropipeta. Se realizó la electroforesis durante 120 min a 88 voltios, al terminar los geles fueron separados de los cristales y se eliminó el gel de concentración.

Las proteínas ya separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinideno (Amersham Hybond TM-P GE Healthcare) con un sistema semiseco Trans-blot SD, Bio-Rad. En buffer de transferencia se colocaron dos papeles filtro gruesos por cada membrana a procesar junto con las membranas (previamente lavadas con metanol durante 5 min y enjuagadas con agua destilada) y se dejaron

enfriar en un refrigerador, posteriormente se colocaron sobre el sistema semiseco en forma de sándwich (papel, membrana, gel, papel) usando un tubo de ensaye para aplanar las capas eliminando burbujas que pudieran evitar la transferencia de las proteínas y marcando la membrana para saber a qué muestras correspondía, después se realizó la transferencia durante una hora a 19 voltios.

Estas membranas fueron posteriormente bloqueadas con leche descremada en polvo al 5 %, diluida en buffer TBST (buffer Tris salino con Tween 20 al 1%) por 2 h a temperatura ambiente en agitación, después se incubaron con un anticuerpo primario contra  $\beta$ -actina (de ratón) (Santa Cruz Biotechnology) durante 18 h a 4°C en una dilución de 1:1000; posteriormente se enjuagaron con TBST en 3 intervalos de 5 min con agitación, para inmediatamente incubarlas con un anticuerpo secundario (de cabra) contra el anticuerpo primario durante 2 h en agitación a temperatura ambiente a una dilución de 1:1000; pasado este tiempo se volvieron a enjuagar 3 veces con TBST en intervalos de 5 min y se realizó el revelado en un cuarto oscuro exponiendo las membranas a una solución de Luminol (1 mL por membrana), dejándola reaccionar un minuto y colocándolas en un hypercassette con una fracción de película sobre cada membrana, se expuso la película a la membrana en un periodo de entre 2 y 12 min dependiendo de la fluorescencia observada, y posteriormente se revelaron con solución reveladora Kodak, agua y solución fijadora Kodak, se enjuagaron y se dejaron secar.

Para obtener los resultados de las demás proteínas, se retiraron los anticuerpos utilizados anteriormente, lavando las membranas en agua desionizada durante 5 min, luego se colocaron las membranas en una solución de hidróxido de sodio (0.2 M) durante 5 min e inmediatamente enjuagando con agua dos veces, una rápida para evitar que siga la reacción y otra de 5 min; por último, se realizaba otro bloqueo con leche descremada en polvo al 5% en buffer TBST durante media hora. Se realizó este procedimiento cada vez que se obtenía un nuevo resultado.

Por último, las películas fueron escaneadas y se evaluó la expresión de las proteínas por densitometría con ayuda de un software especializado, mediante la

evaluación del cociente entre la densitometría del receptor AT<sub>1</sub> y el TGF- $\beta$ 1 contra la proteína estructural  $\beta$ -actina.

### **8.6. Análisis de datos**

Los datos fueron procesados por un análisis de varianza ANOVA, y la prueba de diferencia mínima significativa LSD, considerándose un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  para determinar las diferencias entre los grupos.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1. Extracto metanólico**

Se obtuvieron un total de 33.4 g de extracto metanólico (EM) seco, a partir de 320 g de flores deshidratadas de *C. pentadactylon*, lo que equivale a un rendimiento del 10.43 %.

#### **9.1.1. Compuestos fitoquímicos**

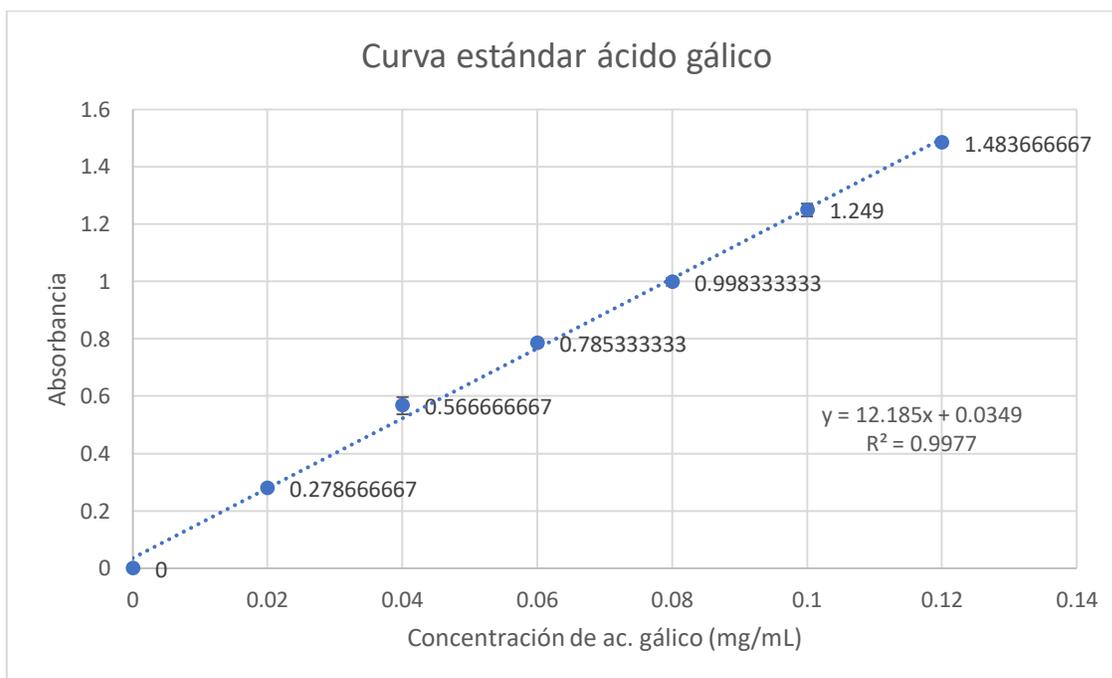
En el extracto metanólico se pudieron identificar compuestos de los tipos saponinas y fenoles, al observarse la presencia de espuma que persistió después de 30 min tras agitar el extracto diluido durante 5 min y la aparición de una coloración azul al añadir gotas de FeCl<sub>3</sub> respectivamente (Tabla 4). En los demás grupos evaluados el resultado fue negativo.

<b>Tipo de compuesto</b>	<b>Resultado</b>
<b>Saponinas</b>	<b>+</b>
<b>Fenoles</b>	<b>+</b>
<b>Terpenoides</b>	<b>-</b>
<b>Alcaloides</b>	<b>-</b>
<b>Coumarinas</b>	<b>-</b>
<b>Lactonas</b>	<b>-</b>

**Tabla 4. Resultados de las pruebas realizadas en el extracto metanólico de *C. pentadactylon* L., en los cuales el signo (+) denomina la presencia de este tipo de compuestos y el signo (-) expresa una reacción negativa.**

### 9.1.2 Fenoles totales

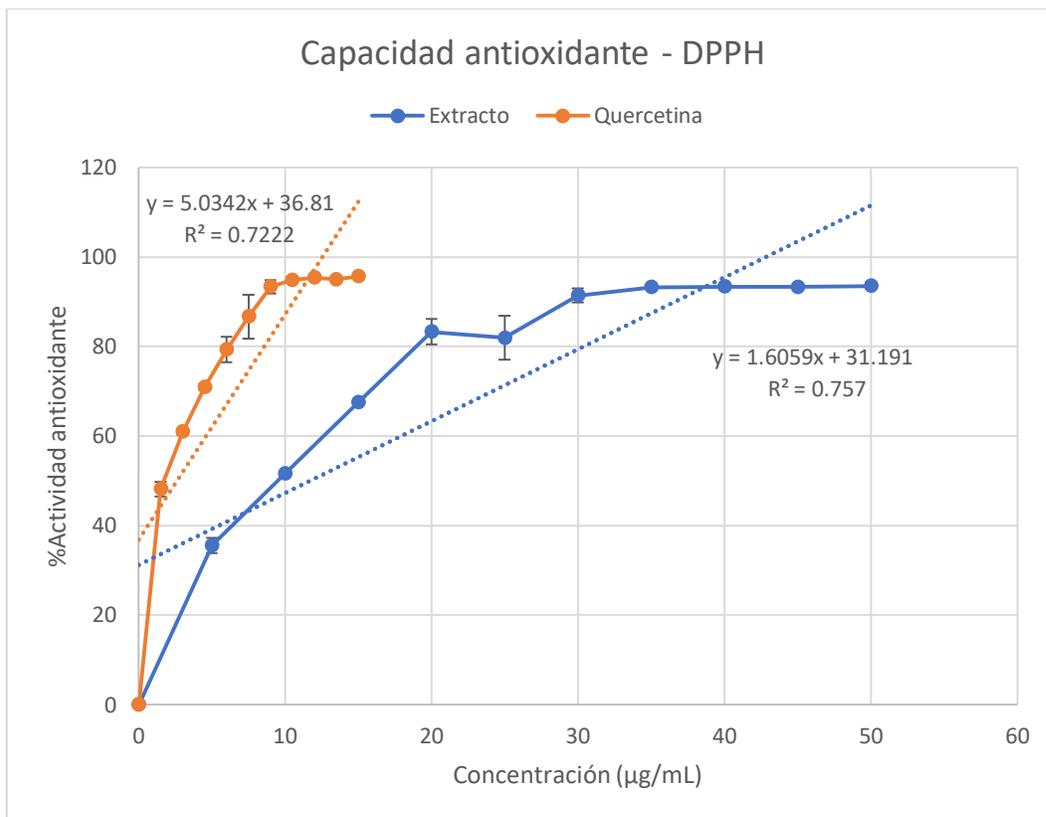
Se generó una curva patrón con concentraciones conocidas de ácido gálico (Figura 1) para estimar la concentración de fenoles en el EM, con el uso de la ecuación de la recta, se encontró una concentración de 0.23 equivalentes de ácido gálico por miligramo de extracto.



**Figura 1. Curva estándar de ácido gálico para conocer la concentración de fenoles en el EM de *C. pentadactylon* Los valores representan la absorbancia media  $\pm$  ESM con  $n=3$ .**

### 9.1.3 Capacidad antioxidante media CA<sub>50</sub>

Al interpolar el valor de la curva generada con el EM después de reducir al 50 % la concentración de DPPH, se elucidó la CA<sub>50</sub> con una concentración de 11.71 µg/mL; en el caso de la curva de quercetina se obtuvo una CA<sub>50</sub> de 2.62 µg/mL. Con esto se observa que la quercetina tiene una mayor capacidad antioxidante en comparación con el extracto metanólico (Figura 2).



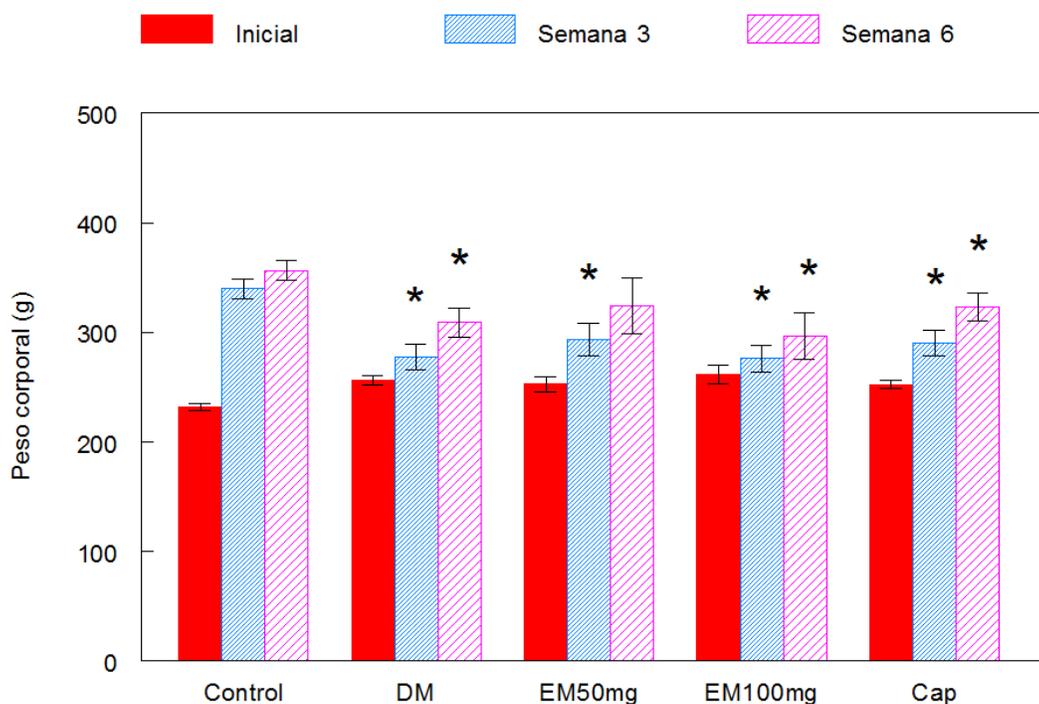
**Figura 2. Curvas generadas con el extracto metanólico (verde), y la quercetina (azul) durante la prueba de reducción del radical DPPH, para determinar la capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) del extracto y compararla con un compuesto antioxidante puro con actividad antioxidante conocida. Los valores representan la media del porcentaje de decoloración de DPPH ± ESM con n=3.**

## **9.2. Modelo de DM tipo 1**

De acuerdo con los valores obtenidos en las mediciones del peso corporal de las ratas, la concentración de glucosa en sangre, la cantidad de alimento y agua que ingerían en 24 h, así como el volumen urinario producido en 24 h, se estableció que el modelo diabético tipo 1 fue replicado con éxito.

### **9.2.1 Peso corporal**

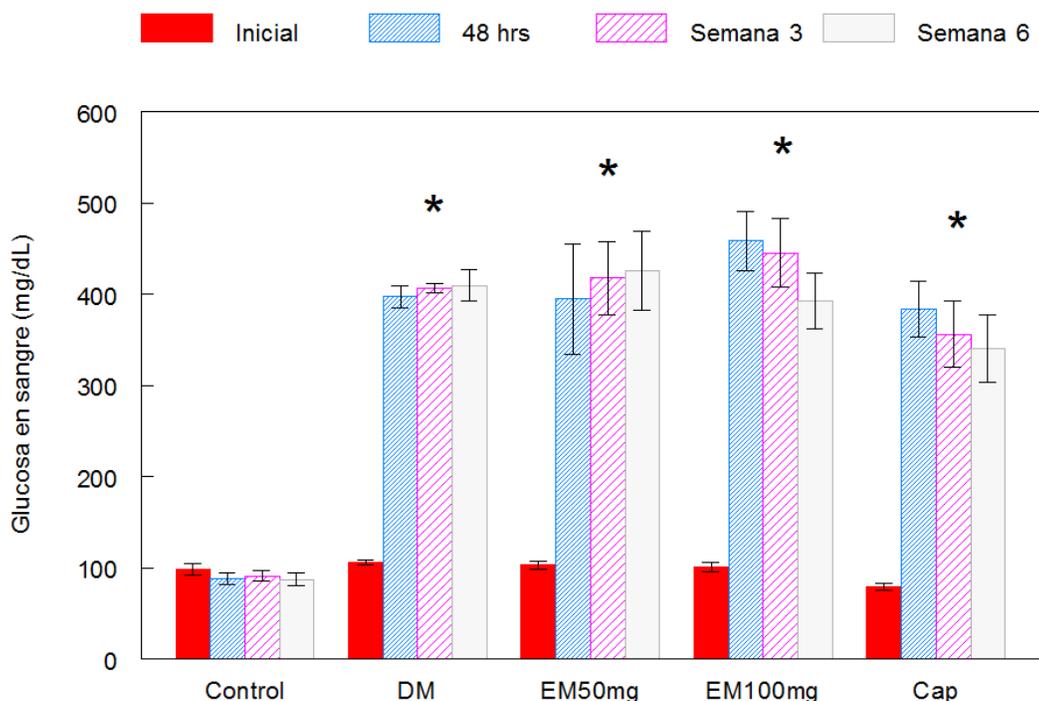
El peso de los organismos aumentó a lo largo del periodo experimental; al comparar los valores de los grupos se pudo observar que los grupos diabéticos lograron un peso corporal menor en comparación con el del grupo control normoglucémico, este comportamiento se mantuvo presente a lo largo del experimento, con excepción del grupo EM50mg en la semana 6, en el cual no hay una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (Figura 3). Tomando en cuenta eso se puede afirmar que los grupos tratados con STZ tuvieron una disminución en su peso corporal en comparación con el grupo normoglucémico control.



**Figura 3. Peso corporal promedio de los organismos a lo largo del periodo experimental (Inicio del experimento, semana 3 y semana 6). Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor ( $\alpha=0.05$ ), los grupos con diferencias significativas con respecto al grupo control se muestran con el símbolo \*.**

### 9.2.2 Glucosa en sangre

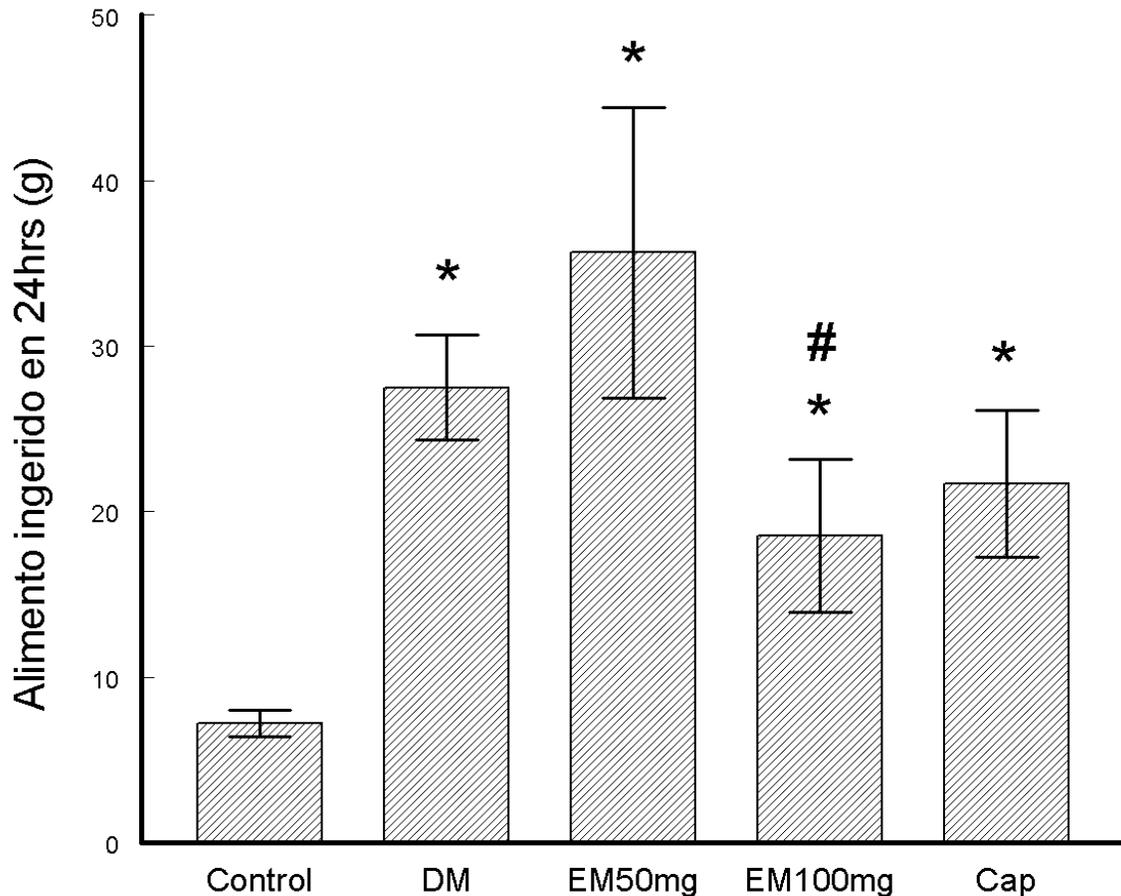
Al medir la concentración de glucosa 48 h después de la administración de STZ en los grupos diabéticos experimentales y el buffer de citratos en grupo control, los organismos de grupos diabéticos aumentaron su glucosa en sangre aproximadamente 4 veces en comparación con la concentración que tenían previamente a la administración, considerándose, así como hiperglucémicos al tener una concentración de glucosa superior a 300 mg/dL. Esta condición se mantuvo a lo largo del experimento como se observa en la figura 4.



**Figura 4. Niveles promedio de glucosa en sangre por cada tratamiento a lo largo del periodo experimental, donde se puede observar un aumento de la concentración de glucosa en los grupos diabéticos experimentales a partir de las 48 horas posteriores a la administración de STZ. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor ( $\alpha=0.05$ ), los grupos con diferencias significativas con respecto al grupo control se muestran con el símbolo \*.**

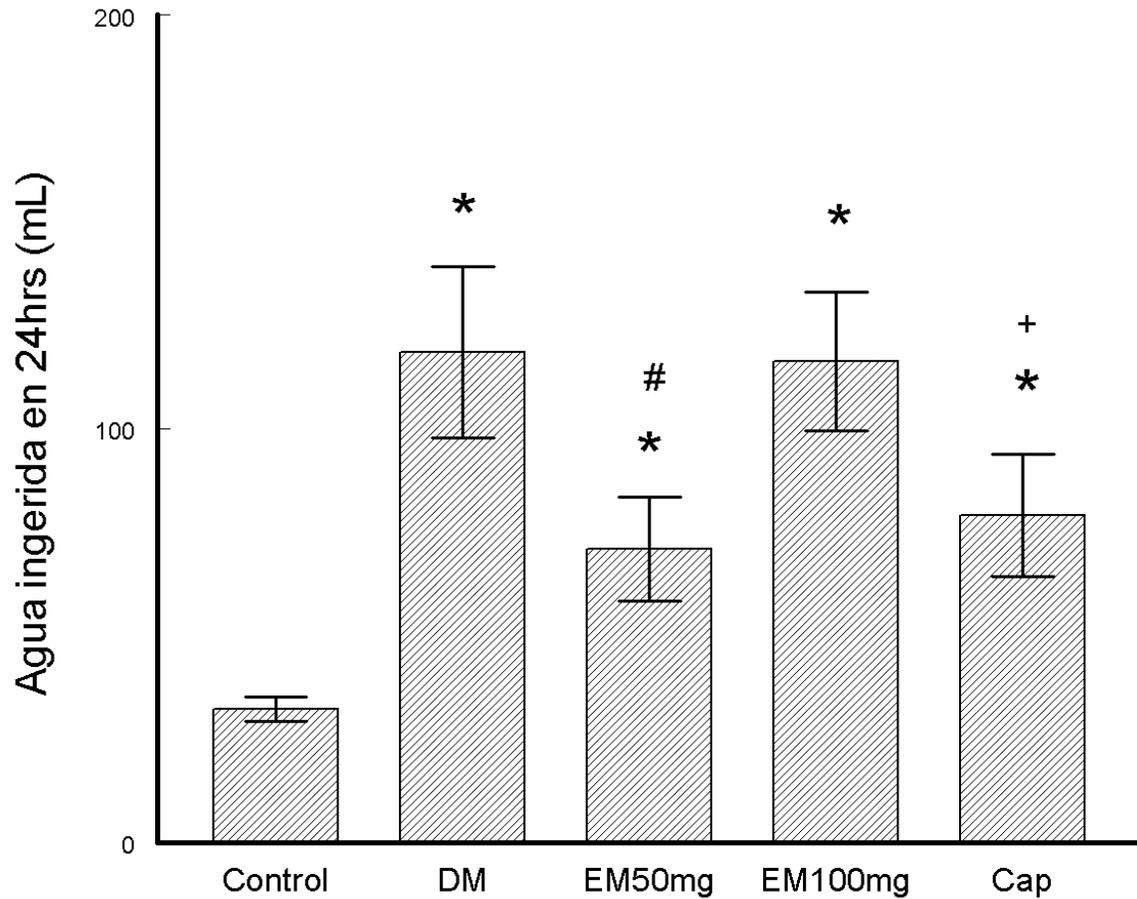
### 9.2.3 Parámetros alimenticios en 24 h

Después de las 24 h en las jaulas metabólicas, se observó que la cantidad de alimento ingerido por las ratas de los grupos diabéticos se incrementó significativamente en comparación con las del grupo control ( $7.19 \text{ g} \pm 0.79 \text{ g}$ ), llegando a aumentar casi cuatro veces esta cantidad en el grupo DM ( $27.5 \text{ g} \pm 3.19$ ), y que los organismos del grupo EM100mg ( $18.54 \text{ g} \pm 4.61 \text{ g}$ ) mostraron una ingesta significativamente menor en comparación con el grupo DM (Figura 5), evidenciando así que los grupos diabéticos presentan polifagia, y que el EM en la concentración de 100 mg/kg pudo disminuir este signo de la DM en contraste con el grupo DM.



**Figura 5. Ingesta promedio de alimento en 24 h de cada grupo. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \* y con el grupo DM con el símbolo #.**

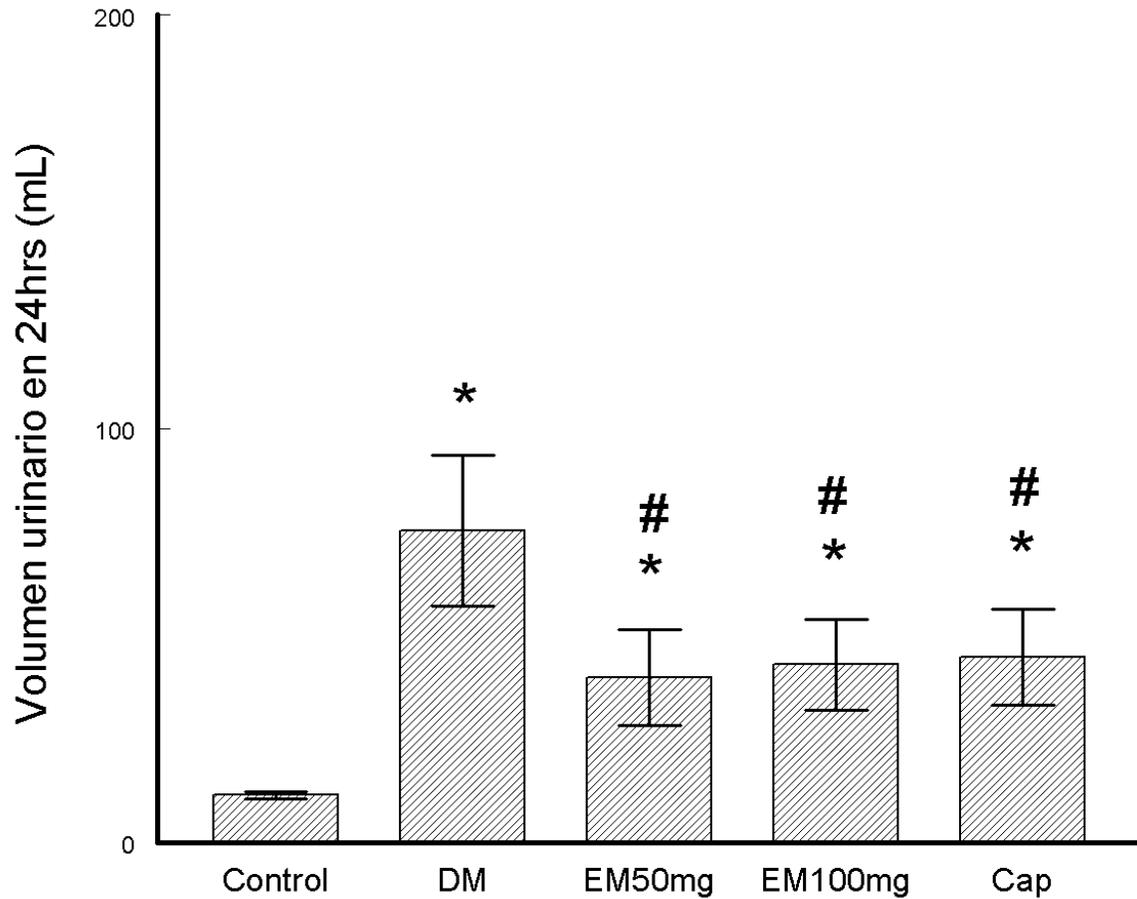
En la figura 6 se muestra la ingesta de agua en 24 h; se puede observar que los grupos diabéticos mostraron un aumento significativo en la ingesta de agua en comparación con el grupo Control ( $32.33 \text{ mL} \pm 2.98 \text{ mL}$ ), llegando a ser más del triple en los casos de los grupos DM ( $118.5 \text{ mL} \pm 20.79 \text{ mL}$ ) y EM100mg ( $116.33 \text{ mL} \pm 16.74 \text{ mL}$ ), pero en el caso del grupo EM50mg ( $71 \text{ mL} \pm 12.48 \text{ mL}$ ) este valor es estadísticamente menor en comparación con el grupo DM, llegando únicamente a poco más del doble del grupo Control. Con esto se pudo identificar la presencia de polidipsia en las ratas diabéticas del experimento y que el EM a una concentración de 50 mg/kg disminuye estadísticamente este signo de la diabetes.



**Figura 6.** Ingesta promedio de agua de cada grupo en 24 h. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \*, con el grupo DM con el símbolo # y con el grupo EM100mg con el símbolo +.

#### 9.2.4 Volumen urinario

La cantidad de orina producida por las ratas se muestra en la figura 7, donde podemos ver que los grupos diabéticos eliminaron una cantidad mayor de esta en 24 h en comparación con el grupo control; en este caso el grupo DM fue el que eliminó más orina en comparación con los tres grupos con tratamientos, con lo cual se observó que tanto el EM en ambas concentraciones como el captopril pudieron disminuir la poliuria provocada por el desarrollo de la DM en las ratas durante el experimento.

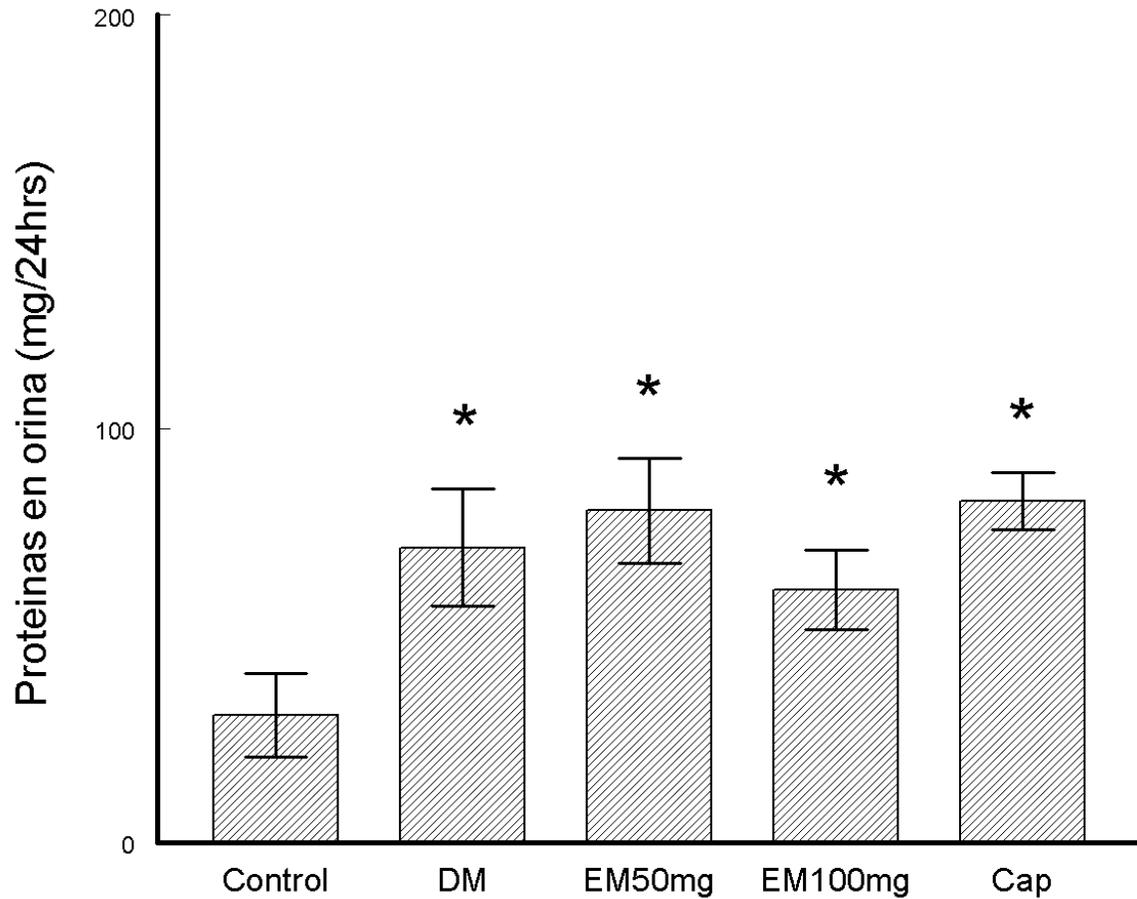


**Figura 7.** Promedio de la orina producida en 24 h por cada grupo. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \* y con el grupo DM con el símbolo #.

### 9.3. Función renal

#### 9.3.1 Proteinuria

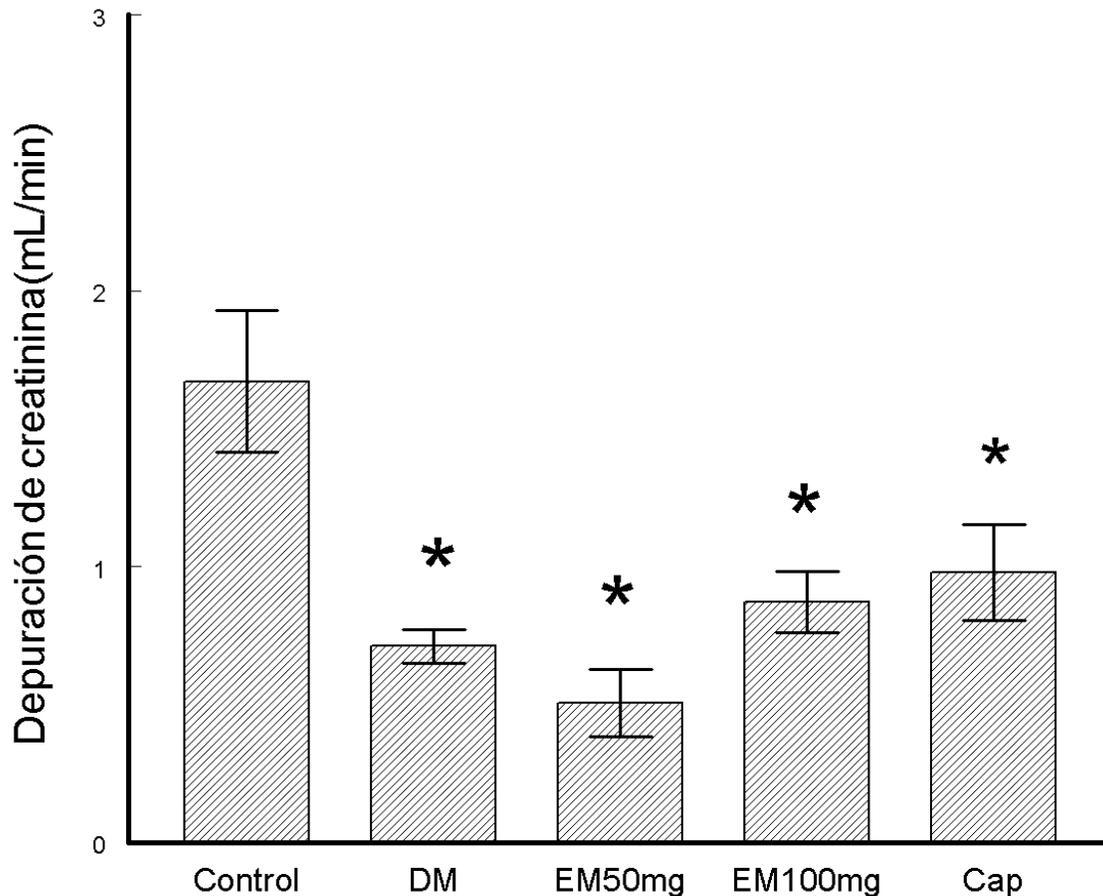
Al analizar la cantidad de proteínas eliminadas a través de la orina por los organismos en los diferentes grupos, se observó que las ratas con DM tuvieron un aumento significativo en este valor en comparación con las ratas del grupo Control, en el caso del grupo EM100mg se puede observar una disminución en la concentración de proteínas en la orina de las ratas (Figura 8), sin embargo esta disminución no es estadísticamente significativa, por lo tanto no se encontró ningún efecto del EM en este parámetro.



**Figura 8.** Concentración promedio de proteínas en orina cada 24 h en cada grupo. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \*.

### 9.3.2 Depuración de creatinina

En el caso de la depuración de creatinina, se puede observar en la figura 9 que los grupos diabéticos presentan una menor eliminación de este metabolito a través de la orina en comparación con los organismos del grupo Control, en el caso de los grupos EM100mg y captopril se puede apreciar una depuración ligeramente más efectiva pero no es estadísticamente significativa en comparación con el grupo DM.

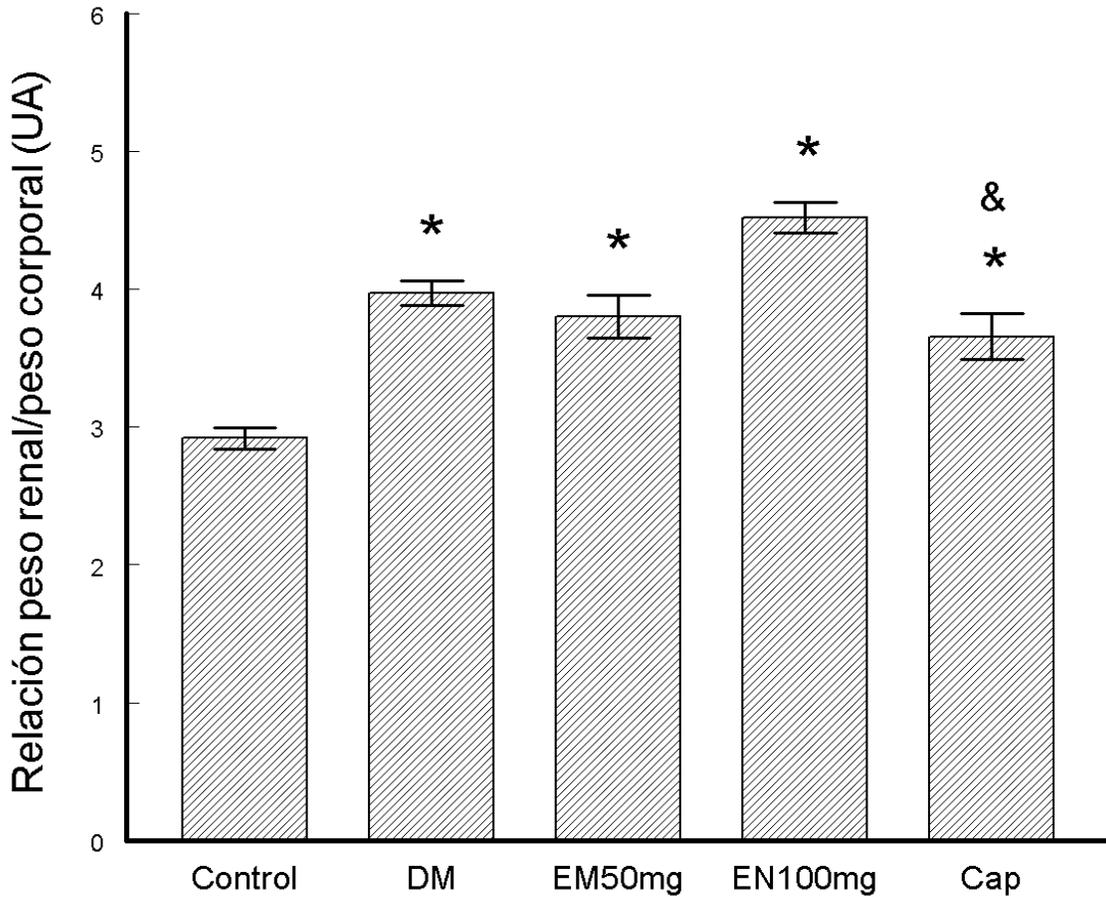


**Figura 9.** Promedio de la cantidad de creatinina eliminada por minuto en cada grupo. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \*.

## 9.4 Hipertrofia renal

### 9.4.1 Relación peso renal/peso corporal

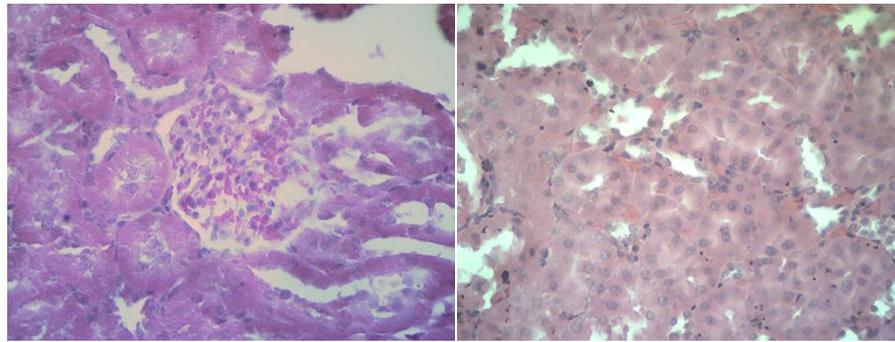
En la figura 10, se puede observar que el valor de la relación peso renal/peso corporal aumenta en los grupos diabéticos, señalando que en estos organismos hubo un aumento en la masa del riñón representando este un peso mayor en los organismos. En los grupos EM50mg se puede observar una leve tendencia a disminuir este parámetro, pero no es estadísticamente significativo al compararlo con el grupo DM; sólo el tratamiento con captopril redujo este indicador de hipertrofia renal en las ratas DM.



*Figura 10. Valores promedio de la relación peso renal/peso corporal en cada grupo. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=6$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \* y con el grupo EM100mg con el símbolo &.*

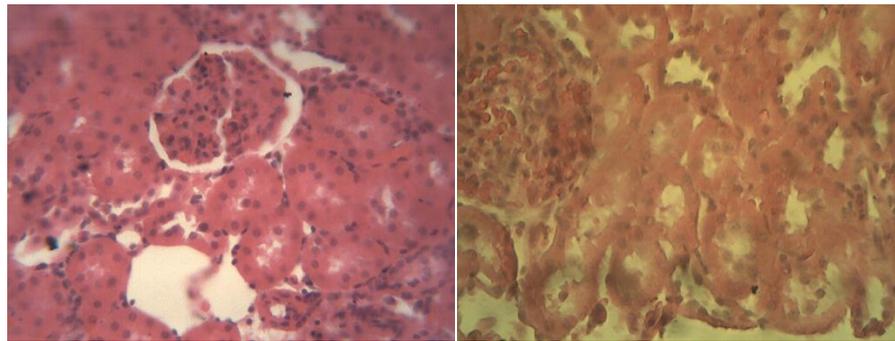
#### 9.4.2 Histología

En cuanto al área celular de las células del tubo contorneado proximal (figuras 11 y 12), se observa un aumento en los organismos diabéticos con excepción del grupo Captopril, el cual no tiene diferencias en comparación con el grupo control, pero puede apreciarse que en ambos grupos tratados con el EM existe una disminución significativa en comparación con el grupo DM, mencionando con especial énfasis al grupo EM50mg ya que este alcanza valores muy aproximados a los de los grupos captopril y Control. Con esto se determinó que el EM retrasa el aumento del área celular en el túbulo contorneado proximal, evitando el progreso de la hipertrofia renal.



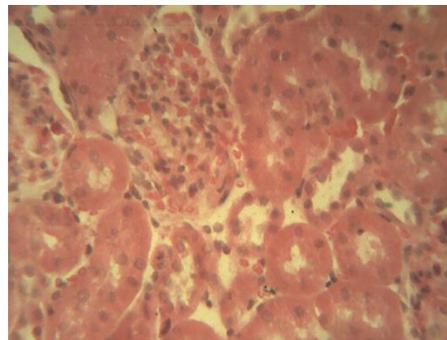
A) Control

B) DM



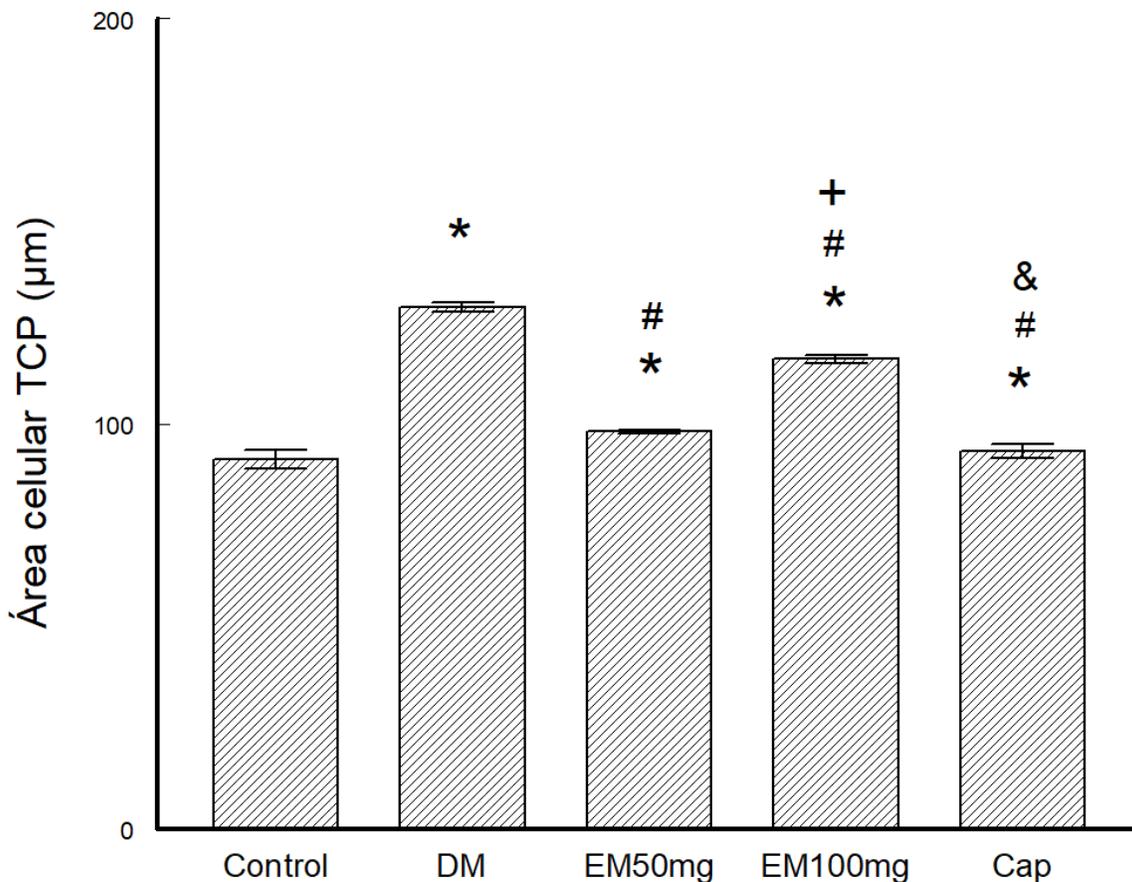
C) Captopril

D) EM50mg



E) EM100mg

**Figura 11. Micrografías (400 X) representativas de los cortes histológicos de riñón teñidos mediante la técnica de Hematoxilina – Eosina. En la imagen A se observan las células del grupo control, en la B las del grupo diabético control, en la C las del grupo tratado con captopri, en el D las del grupo tratado con 50 mg del extracto metanólico y en el E las del grupo tratado con 100 mg de extracto metanólico.**

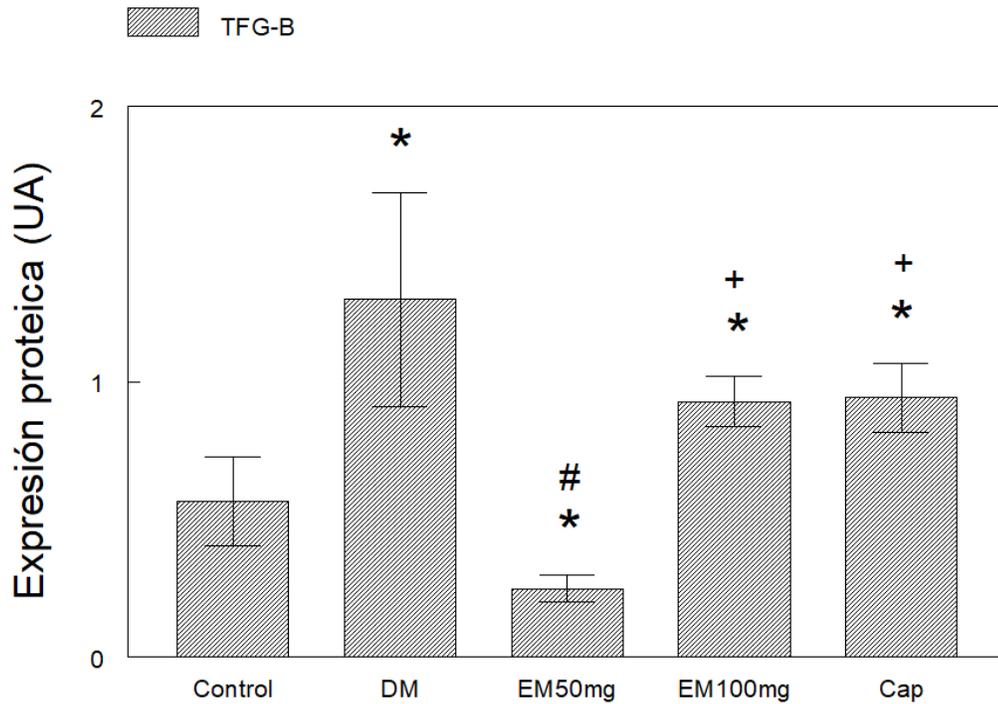


**Figura 12.** Área celular promedio observada en microscopio óptico a un aumento de 400x. Los valores representan la media  $\pm$  ESM con  $n=600$  por tratamiento (100 por portaobjetos y un portaobjeto por sujeto experimental). ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \*, con el grupo DM con el símbolo #, con el grupo EM50mg con el símbolo + y con el grupo EM100mg con el símbolo &.

#### 9.4.3 Expresión proteica

La figura 13 muestra la expresión de la proteína TGF- $\beta$ 1 en la corteza renal de los organismos al final del estudio, se puede apreciar que las ratas del grupo DM aumentaron la concentración de esta proteína hasta llegar aproximadamente al doble de la concentración que se encontró en los individuos del grupo Control, Al observar los grupos EM100mg y captopril se aprecia una tendencia a disminuir esta concentración pero sin diferencias significativas al compararlos con el grupo DM, en cambio en el grupo EM50mg existe una disminución significativa de esta proteína no solamente en comparación con el grupo DM si no también con el grupo Control.

Estos datos muestran que el EM tiene una capacidad para disminuir la expresión de TGF- $\beta$ 1.



**Figura 13.** Concentración promedio de la proteína TGF- $\beta$  en 100 mg de homogeneizado de corteza renal, en relación con la concentración de  $\beta$ -actina presente. Los valores representan la media  $\pm$ ESM con  $n=1$ . ANOVA de un factor con  $\alpha=0.05$ . Los grupos con diferencias significativas en comparación al grupo Control se muestran con el símbolo \*, con el grupo DM con el símbolo # y con el grupo EM50mg con el símbolo +.

## 10. Discusión

Los componentes fitoquímicos encontrados en el estudio preliminar difieren parcialmente con los reportados por Villa-Ruano y col. (2013), donde al igual que en este trabajo (Tabla 2), ellos encontraron la presencia de compuestos fenólicos y mencionan la ausencia de alcaloides; sin embargo, también mencionan que el extracto que analizaron no presenta saponinas y si contiene terpenos. Estas diferencias pueden deberse tanto a factores biológicos como la distribución de los árboles en cuestión, ya que el material biológico usado en este trabajo fue colectado en el Estado de México y no en Oaxaca, y al hecho de que para realizar el extracto se utilizaron las hojas y raíces del árbol, como a que el extracto fue obtenido con etanol. Esto puede explicar también la diferencia en la concentración antioxidante media encontrada por ellos, 102.6  $\mu\text{g/mL}$ , la cual es mucho mayor en comparación a la obtenida en los resultados de este trabajo, que debe ser por la diferencia de concentración de compuestos fenólicos entre las hojas y raíces y las flores del árbol (Figuras 1 y 2).

En los resultados de los parámetros biológicos de los organismos a los que se les administró STZ, tanto alimenticios como de excreción de orina y glucosa en sangre (Figuras 3-7), puede apreciarse que aparecen los síntomas clásicos de un paciente con diabetes mellitus, pérdida de peso, polifagia, polidipsia, poliuria y principalmente la hiperglucemia persistente después de la administración de STZ, lo que confirma que se replicó con éxito el modelo de DM tipo 1 debido a lo siguiente: la STZ es un fármaco conocido por su utilidad para generar modelos de diabetes tanto insulino dependientes (Tipo 1) como no insulino dependientes (Tipo 2), con la aplicación de dosis de entre 40 y 60 mg/kg generalmente, aunque pueden usarse dosis mayores en una sola aplicación como fue el caso de este trabajo (Ganda y col., 1976).

La STZ daña a las células  $\beta$  pancreáticas al entrar en estas utilizando el transportador de glucosa GLUT 2; dentro de ellas genera alteraciones en su ADN, principalmente por alquilación, pero también a través de liberación de moléculas oxidativas como óxido nítrico (NO) y ERO como  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durante el metabolismo de la

STZ, en consecuencia existen alteraciones como por ejemplo en el ciclo de Krebs, el cual se ve inhibido por la unión de NO con la enzima aconitasa, limitando la producción de ATP mitocondrial, de igual manera debido al aumento de la producción del  $O_2^-$  se generan también otras ERO como el  $H_2O_2$  y radicales hidroxilo (OH), los cuales por si mismos generan daño oxidativo en el ADN pero también pueden actuar en conjunto con el ON formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) el cual es altamente tóxico, y finalmente la acción del NO para estimular la ADP-ribosilación, la cual provoca el agotamiento de  $NAD^+$  y la reducción de ATP, inhibiendo la producción de insulina, en conjunto estos mecanismos terminan por dañar y causar la eliminación de las células  $\beta$  pancreáticas (Skudelzki, 2001).

Esta eliminación de las células  $\beta$  pancreáticas es la causa del estado hiperglucémico constante de los organismos de los grupos con DM experimental a los que se les administró STZ (DM, EM50mg, EM100mg y Cap), lo cual en consecuencia causó la aparición de los demás síntomas clásicos de la DM, con los que se puede demostrar la replicación correcta del modelo de DM tipo 1.

La hiperglucemia genera cambios en la hemodinamia debido a la alta concentración de glucosa en la sangre, esta provoca que agua proveniente de las células pase al torrente sanguíneo por osmosis para compensar la cantidad de glucosa, causando deshidratación celular, posteriormente el aumento en la cantidad de agua en el torrente sanguíneo hace que los riñones se vean forzados a filtrar más agua y glucosa, rebasando la capacidad de estos para reabsorber la glucosa por lo que esta se filtra hacia los túbulos renales, donde la glucosa nuevamente provoca que haya una entrada de agua por osmosis hacia dentro de los túbulos, causando de esta manera que haya un aumento en el número de micciones o poliuria (Vázquez y col., 2005).

Al eliminarse constantemente agua por la poliuria y debido al estado de deshidratación celular, el organismo tiende a estimular la sed y por lo tanto a ingerir más agua y con más frecuencia a lo cual se le denomina polidipsia; por otra parte, al no poder utilizar la glucosa que se encuentra en la sangre por la falta de insulina se genera apetito en el organismo, aumentando su ingesta de alimento así como la

frecuencia de sus comidas también llamado polifagia, pero a pesar de esto existe una pérdida de peso causada por la eliminación de la glucosa que es ingerida a través de la orina y a la utilización de fuentes de energía de reserva como las grasas corporales (Guillén González, 2002).

Estos síntomas no parecen ser afectados por el EM en ninguna de sus concentraciones ya que se mantuvieron a lo largo de la duración del experimento, con excepción del tratamiento EM50mg en el parámetro de peso corporal en la última semana (Figura 3). Esto se puede relacionar directamente con el hecho de que como se observa en la figura 4 el EM carece de actividad hipoglucemiante aparente la cual ayude a atenuarlos y su actividad antioxidante no está directamente relacionada con ellos.

En lo que corresponde a la función renal, el tratamiento con el EM no muestra un efecto significativo en cuanto a la proteinuria (Figura 8) ya que se observó únicamente una ligera disminución de la concentración de proteínas en la orina de los organismos del grupo EM100mg en comparación con el grupo DM. Torres y Zacarías (2002) mencionan que este fenómeno es causado por alteraciones en matrices glomerulares extracelulares, como el mesangio y la membrana basal, así como la disminución de síntesis de macromoléculas aniónicas llamadas proteoglicanos lo cual genera la pérdida de la carga negativa de la membrana basal y por lo tanto no puede repeler proteínas como la albúmina, esta membrana tiene como función evitar la filtración de proteínas y su función se ve alterada por el engrosamiento de la misma, el cual ocurre al pasar los años en los humanos. Por lo tanto, es probable que el EM no muestre ningún cambio en este parámetro debido al periodo de tiempo del experimento y que si este se alargara podría observarse un efecto más marcado.

De manera similar en el caso de la depuración de creatinina (Figura 9) el grupo EM100mg muestra una mayor eliminación del metabolito al igual que el grupo Cap en contraste con el grupo DM, pero este aumento en la depuración no es estadísticamente significativo. Amato y col. (2016) encontraron que igualmente el captopril aumenta la depuración de este metabolito en ratas con DM inducida por

STZ, este medicamento funciona como un inhibidor del SRA al inhibir la ECA, y evita que esta active a la angiotensina I al convertirla en angiotensina II, lo que previene de esta forma las alteraciones en la vasoconstricción que provoca al interactuar con su receptor AT1 (Lansang y col., 2001; Romanelli y col., 1989); por lo tanto, es posible que la actividad antioxidante del EM en la concentración de 100 mg/kg también tenga un efecto sobre el SRA y por eso su efecto fue similar al del captopril en este parámetro, pero en un punto diferente de la cascada de señalización del SRA.

En cuanto a la hipertrofia renal, se encontró que en todos los grupos diabéticos experimentales hubo un aumento en la relación peso renal/peso corporal total, solo hubo una ligera disminución en los grupos EM50mg y Cap con respecto del grupo DM. La hipertrofia renal es un proceso que ocurre normalmente al incrementar el tamaño de los riñones debido a la hiperglucemia y el estrés oxidativo, que generan la producción de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 1, causando el aumento de matriz extracelular y el crecimiento excesivo de las células mesangiales. En diversos trabajos se ha tratado esta afección a través del uso de antioxidantes y bloqueadores del SRA con resultados favorables, ya que estos inhiben la sobreproducción de TGF- $\beta$ 1 y evitan de esta manera el crecimiento celular excesivo y la hipertrofia (Vázquez-Cruz y col., 2018; Amato y col., 2016; Jiao y col., 2011), debido a esto es probable que el efecto antioxidante del EM en la concentración de 50 mg/kg haya podido evitar este efecto en las células mesangiales de las ratas.

Se sabe que el estrés oxidativo genera el aumento de la actividad del TGF- $\beta$ 1, esto ocurre debido al exceso de ERO que causan diversas señalizaciones de estrés en las células renales, lo cual, entre otras cosas, causa el aumento de la producción de angiotensina II en las células, provocando que el TGF- $\beta$ 1 se exprese en mayor cantidad debido a la producción de protooncogenes que facilitan su expresión, y debido a esto las células mesangiales aumentan el tamaño de su matriz extracelular hasta terminar obstruyendo la luz de los capilares glomerulares en consecuencia de una alteración del ciclo celular en la que se genera la síntesis de proteínas sin replicación de ADN al inducir inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, se

evita su apoptosis por la inhibición de proteasas y la membrana basal glomerular aumenta su tamaño perdiendo de esta manera su selectividad y capacidad de filtración de moléculas (Calderón y col., 2013; Schultz Johansen y col., 2005; Islas y Revilla, 2004; Bárcena y Colchero, 1999), por lo tanto el efecto antioxidante del EM pudo haber aminorado el daño causado por las ERO en las células renales causando el efecto observado en las figuras 8, 9 y 10, donde se puede observar una tendencia a mejorar la función renal de los organismos tratados.

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio histológico realizado, se puede observar en la figura 11 una clara disminución del área de las células del túbulo contorneado proximal en los grupos tratados, tanto con ambas concentraciones del EM como con captopril en comparación de las células de los organismos del grupo DM, llegando incluso a obtenerse valores muy cercanos a los del grupo control en el caso del grupo EM50mg. Estos resultados se relacionan directamente con la expresión proteica de TGF- $\beta$ 1 que se observa en la figura 11, donde vemos que de igual manera los organismos del grupo DM tienden a aumentar la expresión de esta proteína y los grupos tratados con el EM en ambas concentraciones y con captopril disminuyeron en comparación la expresión de esta proteína, especialmente el grupo EM50mg en el que esta diferencia fue estadísticamente significativa y la producción disminuyó a un valor incluso menor que en el grupo control normoglucémico.

Estos resultados pueden compararse con otros estudios en los que se han probado tratamientos similares. Por ejemplo, Huan-Wei y col. (2019) utilizaron un extracto acuoso de *Nelumbo nucifera* en un modelo de DM tipo 2 en ratas con una alimentación alta en grasas, y lograron disminuir el daño de las células tubulares renales causado por la hiperglucemia, en las cuales se pudo observar una disminución en la producción de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento, tanto con la alimentación alta en grasas como con una dieta normal, lo que evita así la hipertrofia renal, y se atribuyen estos efectos a la capacidad antioxidante del extracto compuesto en su mayoría por flavonoides, principalmente quercetina-3'-glucurónido. En este estudio, a pesar de que no se aborda directamente, puede

intuirse un efecto similar al de los resultados obtenidos en este trabajo en la expresión del TGF- $\beta$ 1 debido a las cantidades de matriz extracelular observable en sus mediciones, debido al papel que desarrolla el TGF- $\beta$ 1 en la expresión del colágeno (Gálvez-Gastélum y col., 2004).

En otro caso, en el trabajo realizado por Amato y col. (2016) se utilizó un tratamiento que consistía en la administración de Angiotensina (1-7) exógena, la cual pudo inhibir la vía de MAP cinasas (MAPK) que es estimulada por las altas concentraciones de glucosa, y de esta forma disminuyen la expresión de TGF-  $\beta$ 1 en células del tubulo proximal y en consecuencia atenuando el incremento del tamaño de estas en comparación con los organismos diabeticos sin el tratamiento. Al comparar los resultados del estudio de Amato y col. (2016) con los obtenidos en este trabajo, Schultz y col. (2005) mencionan que hay una relacion directa entre la señalización de estrés producida por la sobreproducción de ion  $O_2^-$ , entre las cuales entra la p38 MAPK, con el aumento en la producción de angiotensina II que en consecuencia genera, entre otras cosas, el aumento en la expresión de TGF-  $\beta$ 1 en las células renales, por lo tanto el efecto antioxidante del EM de *C. pentadactylon* pudo haber inhibido el efecto de esta señalización de estrés al disminuir la cantidad de  $O_2^-$  en los organismos tratados, especialmente en la concentración de 50 mg/Kg.

## 11. Conclusiones

- El extracto metanólico de *C. pentadactylon* mejoró ligeramente la función renal de una manera no significativa
- El extracto metanólico de *C. pentadactylon* evitó la hipertrofia renal debido al efecto de su capacidad antioxidante en la inhibición de los daños causados por el estrés oxidativo en la diabetes mellitus
- El extracto metanólico de *C. pentadactylon* inhibió parcialmente de la expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$ .

## Literatura citada

- Albertoni, G., Schir, N. (2014). *Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease - mini review*. São Paulo, Brasil: Universidad federal de São Paulo. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 37(1), 106-114.
- Amato, D., Núñez-Ortiz, A., Benítez-Flores, J., Segura-Cobos, D., López-Sánchez, P., and Vázquez-Cruz, B. (2016). Role of Angiotensin-(1-7) on Renal Hypertrophy in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Pharmacology and Pharmacy*, 7, 379-395.
- Andrade-Cetto, A., and Heinrich, M. Mexican plants whit hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325-348.
- Aranda-Ventura, J., Villacrés, J., Mego, R., y Delgado, H. (2014). Efecto de los extractos de *Geranium ayavacense* W. (Pasuchata) sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2), 261-266.
- Bárcena, J., y Colchero, C. (1999). *Introducción a la nefrología*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brocca, H., and Tovar, S. (1 de septiembre de 2000). Flor de manita (Mano de León o mecapalxóchitl) *Chiranthodendron pentadactylon*. Obtenido de [liberadictus.org/la-hierba-del-mes/617\\_flor-de-manita.html](http://liberadictus.org/la-hierba-del-mes/617_flor-de-manita.html)
- Bye, R., and Linares, E. (1983). The role of plants found in the Mexican markets and their importance in Ethnobotanical Studies. *Journey of Ethnobiology*, 3(1), 1-13.
- Calderón, J., Muñoz, E., y Quintanar, M. (2013). Estrés oxidavito y diabetes mellitus. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(2), 53-66.
- Calzada, F., Juárez, T., García-Hernández, N., Valdez, M., Ávila, O., Yopez, L., and Velázquez, C. (2017). Antiprotozoal, Antibacterial and Antidiarrheal Propierties from the Flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and isolated flavonoids. *Pharmacognosy Magazine*, 13(50), 240-244.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., and Aguilar, A. (2006). In vitro susceptibility of Entamoeba Hystolytica and Giardia lamblia to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 367-370.
- Das, E., and King, G. (2007). The role of protein kinace C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological Research*, 55(6), 498-510.
- Dey, P. and Harborne, J. B. (1989). *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant Phenolics*. Academic Press Ltd. pp 552. London, United Kingdom.
- Díaz, D. (2006). Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [Online]*, 25(3).

- Díaz, E. (2015) Protección de la vitamina E en las alteraciones morfo-funcionales de la nefropatía diabética y su relación con la angiotensina II (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, México.
- Ezquivel-Gutiérrez, E., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M., Saavedra-Ntoling, A., y Salgado-Garciglia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1), 45-52.
- Gálvez-Gastélum, F., Sandoval-Rodríguez, S., y Armendáriz-Borunda, J. (2004). El factor de crecimiento transformante  $\beta$  como blanco terapéutico. *Salud Pública de México*, 46(4), 341-350.
- Ganda, O., Rossi, A., and Like, A. (1976). Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*, 25, 595-603.
- Green, K., Brand, M., and Murphy, M. (febrero de 2004). Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes*, 53(1), 110-118.
- Guillén-González, M. (2002). Diabetes mellitus: cómo se manifiesta, cómo evoluciona y cómo se complica. *Ciencia*, 53(3), 54-62.
- Hernández, J., Licea, M., Hernández, P., Abraham, E., y Yanes, M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 58(1), 4-15.
- Huan-wei, C., Mon-Yuan, Y., Tung-Wei, H., Yun-Ching, C., and Chau-Jong, W. (2019). Nelumbo nucifera leaves extract attenuate the pathological progression of diabetic nephropathy in high-fat diet-fed and streptozotocin-induced rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27, 736-748.
- International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas*. Recuperado el 28 de noviembre de 2019, de "https://diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF\_Atlas\_9th\_Edition\_2019.pdf"
- Islas, S., y Revilla, M. (2005). Diabetes mellitus: concepto y nueva clasificación. En S. Islas, and M. Revilla, *Diabetes Mellitus* (págs. 3-20). Mc Graw Hill. Ciudad de México, México.
- Jaffé, M. (1886). Über den niederschlag, welchen pikrinsäure in normalen hrn erzeugt und über eine neue reaction des kreatinins. *Biological Chemistry*, 10, 391-400.
- Jiao, B., Wang, Y., Cheng, Y., Gao, J., and Zhang, Q. (2011). Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF- $\beta$ 1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels. *BioScience Trends*, 5(4), 173-181.
- Landmesser, U., Cai, H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo, H., and Harrison, D. (2002). Role of p47 (phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*, 40, 511-515.
- Lansang, C., Price, D., Laffel, L., Osei, S., Fisher, N., Erani, D., and Hollenberg, N. (2001). Renal vascular responses to captopril and to candesartan in patients with type 1 diabetes mellitus. *Kidney International*, 59, 1432-1438.

- Mogensen, C., Christensen, C., and Vittinghus, E. (1983). The Stage in Diabetic Renal Disease: Whit Emphasis on the Stage of Incipient Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 32(2), 64-78.
- Mora, R., Gudiño, A., Leiva, A., Riestra, A., Salazar, L., Mouthar, S., y Tabete, E. (2009). Manejo terapéutico del daño renal con antioxidantes en pacientes diabéticos. Caso clínico. *Informe Médico*, 11(9), 535-539.
- Olson, C. (1986). *Diabetes mellitus: Diagnóstico y tratamiento*. Madrid, España: Ediciones científicas.
- Ortega-Pierres, L., Higareda-Mendoza, A., Pardo-Galván, M. B.-P., Gómez-García, A., Farías-Rodríguez, V., y Álvarez-Aguilar, C. (2007). Implicaciones del sistema renina-angiotensina en la nefropatía diabética. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 45(6), 601-610.
- Palomo, I., Gutiérrez, M., Astudillo, L., Rivera, C., Torres, C., Guzmán, L., Moore-Carrasco, R., Carrasco, G., y Alarcón, M. (2009). Efecto antioxidante de frutas y hortalizas de la zona central de Chile. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(2), 152-158.
- Pereira, O., Palay, M., Rodríguez, A., y Neyra, R. (2015). La diabetes mellitus y las complicaciones cardiovasculares. *Revista Médica de Santiago de Cuba*, 19(5), 675-583.
- Perusquia, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E., and Mata, R. (1995). Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 63-69.
- Prahastuti, S., Hidayat, M., Hasiana, S., Widiwati, W., Amalia, A., Qodariah, R., and Khairiyah, Z. (2019). Ethanol Extract of Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* L.) as therapy for Chronic Kidney Disease in *Invitro* Model. *Journey od Reports in Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 229-235.
- Rivas, K., Muñoz, L., Pino, C., y Balcázar, N. (2015). Actividad antioxidante, contenido fenólico total y citotoxicidad de extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas. *Revista de Plantas Medicinales*, 20(3), 277-289.
- Romanelli, G., Giustina, A., Cimino, A., Vaentini, U., Agabiti-Rosei, E., Muesan, G., and Giustina, G. (1989). Short term effect of captopril on microalbuminuria induced by exercise in normotensive diabetes. *British Medical Journal*, 298, 284-288.
- Santeliz, H., Romano, L., González, A., y Hernández, H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21-29.
- Schultz Johansen, J., Harris, A., Rychly, D., and Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cadriovascular Diabetology*, 4(5), 1-11.
- Secretaría de salud. (2007). *Protocolo clínico para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes*. Ciudad de México, México: CENAPRECE.
- Secretaría de salud. (2007). *Protocolo clínico para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes*. Ciudad de México, México: Secretaría de salud.

- Singleton, V. and Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Skudelzki, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50, 536-546.
- Toledo, V. (1975). Chirantodendron pentadactylon Larreategui (Sterculiaceae): una especie polinizada por aves percheras. *Boletín de la Sociedad Botánica en México.*, 35, 59-67.
- Topete-Reyes, J. (2015). TGF- $\beta$  y otras moléculas profibróticas en enfermedad renal crónica. *Revista Médica MD*, 6(2), 104-110.
- Torres Vilorio, A., y Zacarpías Castillo, R. (2002). Nefropatía diabética. *Revista del Hospital General Dr. Manuel Gea González*, 5, 24-32.
- Triana, M., Chirino, N., Fernández, J., Zapata, J., Morejón, O., Adan, D., y Fernández, A. (2010). Glibencladina y lipoproteínas modificadas en diabéticos tipo 2 con macroangiopatía. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculard*, 11(1), 76-88.
- Ugarte, F., y Carranza, C. (2002). Nefropatía diabética. *Revista Chilena de Pediatría*, 73(5), 455-460.
- Vázquez, B., Meza, L. e Islas S. (2005). Nefropatía diabética. En S. Islas, and M. Revilla, *Diabetes Mellitus* (págs. 330-359). Mc Garw Hill. Ciudad de México, México.
- Vázquez-Cruz, B., Segura-Cobos, D., Serrano-Parrales, RR., and Amato, D. (2018). Effect of the methanolic extract of Porophyllum tagetoides on diabetic nephropathy. *PharmacologyOnline*, 3, 363-374.
- Velázquez, C., Correa-Basuro, J., García-Hernández, N., BaArbosa, E., Tesoro-Cruz, E., Calzada, S., and Calzada, F. (2012). Anti-diarreal activity of (-)-Epicatechin from Chiranthodendron pentadactylon Larreat: Experimental and Computational Studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 716-719.
- Villa-Ruano, N., Zurita-Vásquez, G., Pacheco-Hernández, Y., Betancourt-Jiménez, M., Cruz-Dúran, R., and Duque-Bautista, H. (2013). Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biological Research*, 46, 153-160.
- Villa-Ruano, N., Zurita-Vásquez, G., Pacheco-Hernández, Y., Betancourt-Jiménez, M., Cruz-Durán, R., and Duque-Bautista, H. (2013). Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biological Research*, 46, 153-160.
- Yamagishi, S. (2010). Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental Gerontology*, 46(4), 217-224.
- Yeh, G., Kaptchuk, J., Eisenberg, D., and Phillips, R. (2003). Systematic Review of Herbs and Dietary Supplements for Glycemia Control in Diabetes. *Diabetes Care*, 26(4), 1277-1294.