



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
opción **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCÉMICA, HIPOLIPIDÉMICA Y
ANTIOXIDANTE DE *Eryngium carlinae* EN RATAS DIABÉTICAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
**DOCTORA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

M. EN C. RUTH NORIEGA CISNEROS

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO DEL 2013

*“Por muy alta que sea una colina
siempre hay un sendero hacia su cima”*

DEDICATORIA

*A mis padres, **Eva** y **J. Cruz**, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, su confianza y su inmenso amor que siempre me han demostrado.*

*A mi esposo, **Cristian**, quien realmente sabe que el verdadero amor no es otra cosa que el deseo inevitable de ayudar al otro para que sea quien es, gracias por compartir tu vida conmigo, te amo.*

*A mis hijos, **Gael** y **Megan**, son mi mayor alegría y la fuerza que me impulsa en la vida, gracias por hacerme la mamá más feliz, los amo.*

*A mis hermanos, **Julián** y **J. Cruz**, que aunque estemos a gran distancia, los sentimientos de apoyo y buenos deseos están siempre cerca. A **Paty** y **Fernandito**, bienvenidos a nuestra familia.*

*Al **Dr. Saavedra** y a **Moni**, por brindarme ya desde hace tanto tiempo su apoyo y amistad, y hacerme sentir como en familia.*

*Al **Dr. Salgado** y a **Alejandra**, por el apoyo recibido y por los momentos agradables de convivencia en su laboratorio.*

*Al **Dr. Salvador Manzo**, por sus consejos y amistad brindada.*

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| Dedicatoria | i |
| Índice | ii |
| Índice de cuadros y figuras | v |
| Lista de abreviaturas | vi |
| Agradecimientos | vii |
| | |
| 1. RESUMEN GENERAL | 1 |
| 2. SUMMARY | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN GENERAL | 5 |
| 3.1 Diabetes mellitus | 5 |
| 3.1.1 Definición, clasificación y diagnóstico | 5 |
| 3.1.2 Las complicaciones macrovasculares y la dislipidemia diabética | 6 |
| 3.1.2.1 Alteraciones en el metabolismo y transporte de los lípidos en la diabetes | 7 |
| 3.1.3 Las complicaciones microvasculares y la nefropatía diabética | 11 |
| 3.1.3.1 La hiperglucemia y el estrés oxidativo en la diabetes | 11 |
| 3.2 Estudio de las plantas empleadas en la medicina tradicional | 12 |
| 3.2.1 Compuestos de interés biológico presentes en las plantas | 13 |
| 3.3 <i>Eryngium carlinae</i> | 14 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 17 |
| 5. HIPÓTESIS | 17 |
| 6. OBJETIVOS | 18 |
| 6.1 Objetivo general | 18 |
| 6.2 Objetivos específicos | 18 |
| 7. RESULTADOS | 19 |
| 7.1 Capítulo 1: Actividad hipolipidémica de <i>Eryngium carlinae</i> en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina | 20 |

| | Página |
|--|--------|
| Resumen | 20 |
| Hypolipidemic activity of <i>Eryngium carlinae</i> on streptozotocin-induced diabetic rats. 2012. Noriega-Cisneros R, Ortiz-Ávila O, Esquivel-Gutiérrez E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Salgado-Garciglia R, Cortés-Rojo C, Boldogh I, Saavedra-Molina A. <i>Biochem Res Int</i> 2012:603501 | 21 |
| Abstract | 21 |
| Introducción | 21 |
| Materiales y Métodos | 22 |
| Resultados | 22 |
| Discusión y Conclusión | 23 |
| Bibliografía | 24 |
| 7.2 Capítulo 2: El efecto hipolipidémico de <i>Eryngium carlinae</i> observado en ratas diabéticas es comparable al de la atorvastatina pero por un mecanismo que no implica inhibición de la HMG-CoA reductasa | 26 |
| Resumen | 26 |
| Abstract | 27 |
| Introducción | 28 |
| Materiales y Métodos | 29 |
| Resultados y Discusión | 35 |
| Conclusión | 46 |
| Anexos | 46 |
| Bibliografía | 48 |
| 7.3 Capítulo 3: Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Eryngium carlinae</i> | 53 |
| Resumen | 53 |
| Abstract | 54 |
| Introducción | 55 |
| Materiales y Métodos | 56 |
| Resultados | 62 |

| | Página |
|---------------------------------|--------|
| Discusión | 74 |
| Conclusión | 76 |
| Bibliografía | 76 |
| 8. DISCUSIÓN GENERAL | 80 |
| 9. CONCLUSIÓN GENERAL | 86 |
| 10. PERSPECTIVAS | 87 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA | 88 |

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| <i>Introducción General</i> | |
| Figura 1. Digestión y absorción intestinal de lípidos | 7 |
| Figura 2. Transporte de lípidos exógenos y endógenos por las lipoproteínas | 9 |
| Figura 3. Plantas de <i>Eryngium carlinae</i> | 15 |
| <i>Capítulo 1</i> | |
| Cuadro 1. Effect of <i>E. carlinae</i> on body weight and blood glucose | 23 |
| Cuadro 2. Effect of <i>E. carlinae</i> on hemoglobin and glycosylated hemoglobin (HbA1c) | 23 |
| Cuadro 3. Effect of <i>E. carlinae</i> on biochemical parameters after oral administration during 40 days | 24 |
| <i>Capítulo 2</i> | |
| Cuadro 1. Separación e identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> por CG-EM | 35 |
| Cuadro 2. Efecto de <i>EC30</i> , <i>F6EC30</i> y <i>F6EC3</i> sobre el consumo de agua, alimento, IEA y porcentaje de ganancia de peso al término de la administración oral durante 40 días | 38 |
| Cuadro 3. Efecto de <i>EC30</i> , <i>F6EC30</i> y <i>F6EC3</i> sobre la glucosa y el perfil de lípidos al término de la administración durante 40 días | 40 |
| Figura 1. Efecto de <i>EC30</i> sobre la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en microsomas de hígado de rata | 43 |
| Figura 2. Efecto de <i>EC30</i> sobre los niveles del receptor LDL en microsomas de hígado de rata | 44 |
| Anexo 1. Esquema del método de separación del extracto de <i>E. carlinae</i> | 46 |
| Anexo 2. Cromatograma representativo del análisis del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> | 47 |
| <i>Capítulo 3</i> | |
| Cuadro 1. Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de <i>E. carlinae</i> | 63 |
| Cuadro 2. Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH [•] y por el método del radical ABTS ^{•+} de los extractos <i>E. carlinae</i> | 65 |
| Cuadro 3. Efecto de <i>E. carlinae</i> sobre el peso del hígado y los riñones de las ratas tratadas durante 40 días con el extracto | 67 |
| Figura 1. Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> sobre los niveles de NO en las mitocondrias de riñón de rata | 68 |
| Figura 2. Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> sobre los niveles de TBARS en las mitocondrias de riñón de rata | 69 |
| Figura 3. Efecto del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en mitocondrias de riñón de rata | 71 |
| Figura 4. Fotografía de cortes histológicos de páncreas de rata | 72 |
| Figura 4. Fotografía de cortes histológicos de riñón de rata | 73 |
| <i>Discusión General</i> | |
| Figura 1. Mecanismo propuesto de la acción hipolipidémica del extracto etanólico de <i>E. carlinae</i> | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA SIGNIFICADO

| | |
|---------|---|
| ABTS | Ácido 2,2' azinobis-[3 etilbenzotiazolina]-6-sulfónico |
| ACAT | Colesterol acil-CoA-aciltransferasa |
| AGES | Productos finales de glucosilación avanzada |
| Apo | Apoproteína |
| CAET | Capacidad antioxidante equivalente a trolox |
| CAT | Catalasa |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas |
| C-HDL | Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad |
| C-LDL | Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad |
| DM | Diabetes mellitus |
| DPPH | 1,1-difenil-2-picrilhidracil |
| ERO | Especies reactivas de oxígeno |
| HbA1c | Hemoglobina glucosilada |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HMG-CoA | 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA |
| IA | Índice aterogénico |
| IDL | Lipoproteínas de densidad intermedia |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LDL-r | Receptor para lipoproteínas de baja densidad |
| LPL | Lipoproteína lipasa |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| PK | Proteína cinasa |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| STZ | Estreptozotocina |
| TAG | Triacilglicéridos |
| TRC | Transporte reverso de colesterol |
| VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Saavedra Molina, por su asesoría y apoyo recibidos durante la realización de éste trabajo, pero sobre todo por confiar en mí y haberme recibido por segunda vez en su laboratorio, siempre se lo agradeceré.

Al Dr. Rafael Salgado Garciglia, por su asesoría y apoyo recibidos durante la realización de éste trabajo y por haberme mostrado un área de conocimiento maravillosa que desconocía, es muy valioso para mí lo aprendido en su laboratorio.

Al Dr. Salvador Manzo Ávalos, todas las opiniones que me brindaste me enriquecieron y me han enseñado a valorar los consejos de los demás.

A la Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero, por sus consejos y apoyo prestado para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. Carlos Cervantes Vega, al Dr. Héctor Riveros Rosas y al Dr. Rafael Villalobos Molina, por su participación como parte del comité tutorial por todas las aportaciones realizadas a lo largo del desarrollo de este trabajo, sus enseñanzas siempre serán bien recibidas; a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y al Dr. Salvador Manzo Ávalos por las correcciones y sugerencias realizadas a este manuscrito.

A la Bióloga Yolanda García Rodríguez, por su entusiasmo y amistad que me ha brindado y por su ayuda con el análisis cromatográfico.

A la Q.F.B. Rosa Edith Zavala Vivanco por las facilidades proporcionadas para la realización de las primeras determinaciones bioquímicas.

Al Téc. Israel Aviña Guerrero por su ayuda con el procesamiento de las muestras histológicas y a la M. en C. Marcela Rojas Lemus por su ayuda con el análisis y con la interpretación de las mismas.

Al Dr. Héctor Riveros Rosas por su apoyo para la realización de los experimentos de la evaluación del potencial antioxidante de los extractos in vitro.

A la Dra. Elizabeth Calderón y al Dr. Christian Cortés, por su asesoría y apoyo que siempre me han brindado, pero sobre todo por su amistad y por hacerme parte de su familia.

A mis compañeros Omar, Marisol, Soco y Paco, por su amistad, por su ayuda con el manejo de los animales y por el compromiso que siempre mostraron con este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de Bioquímica por su amistad y buenos momentos.

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

Tesis apoyada por **CONACYT** a través del proyecto 169093 y de la beca 32093.

1. RESUMEN GENERAL

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico causado por una deficiencia absoluta o relativa en la secreción y/o acción de la insulina o ambas y se caracteriza por una hiperglucemia crónica. Como resultado de estas alteraciones, se presentan anormalidades en el metabolismo de carbohidratos y lípidos y un aumento en el estrés oxidativo, lo que da lugar al desarrollo de sus complicaciones y agrava la condición diabética. La incidencia de la DM crece de manera alarmante, por lo que aumenta la necesidad de encontrar alternativas de tratamiento más efectivas y seguras. Es sabido que las personas diabéticas muy frecuentemente consumen remedios extraídos de plantas con o sin prescripción médica, lo que representa un peligro cuando se desconoce la composición química de la planta y sus posibles interacciones farmacológicas, y más aún si su efecto no ha sido estudiado y validado. *Eryngium carlinae*, conocida comúnmente como “hierba del sapo”, es una planta empleada en la medicina tradicional por las personas diabéticas para controlar sus niveles de glucosa y colesterol, sin embargo, a la fecha no hay estudios que validen su efecto. Por lo anterior, fue de nuestro interés analizar la composición química del extracto etanólico de *E. carlinae* y estudiar el efecto de su consumo. Este trabajo plantea que *E. carlinae* puede tener actividad hipoglucémica, hipolipidémica y antioxidante que pueden ofrecer un beneficio a las personas diabéticas que lo consumen. Para comprobarlo, se evaluó el efecto del consumo del extracto etanólico de *E. carlinae* en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ). Se analizaron indicadores de los niveles de glucemia, de lipemia y riesgo cardiovascular así como de la actividad antioxidante en las mitocondrias de riñón. También se realizó un análisis cromatográfico de la composición química del extracto y se evaluó su efecto antioxidante *in vitro*. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *E. carlinae* no tiene efecto hipoglucémico al ser administrado de manera oral a ratas diabéticas inducidas con STZ (45 mg/kg de peso), sin embargo, sí fue capaz de modificar los niveles de colesterol y triacilglicéridos mejorando con esto el perfil lipídico y disminuyendo el índice de riesgo cardiovascular. En cuanto a la actividad antioxidante, el análisis *in vitro* mostró una cantidad importante de compuestos fenólicos y flavonoides relacionados con la actividad antioxidante, sin embargo, en el análisis *in vivo*, el extracto no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de lipoperoxidación y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y

catalasa, sólo se observó una disminución en los niveles de óxido nítrico. En el análisis histológico de los riñones de las ratas tratadas con el extracto de *E. carlinae* se observó que células presentaron menos alteraciones estructurales que las diabéticas. En conclusión, se considera que aunque el extracto de *E. carlinae* no controla la hiperglucemia, si ofrece beneficios sobre el perfil de lípidos y retarda la progresión del daño renal mejorando con así el pronóstico y calidad de vida de los diabéticos.

2. SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is a chronic and progressive disorder characterized by hyperglycemia due to absolute or relative deficiency of insulin. Metabolic disturbances of carbohydrates and lipids and increased oxidative stress are present, which lead to the development of complications and diabetic condition worsens. The diabetic population shows an alarming increase making it necessary to find safe alternatives and effective treatment. It is known that people with diabetes many times consumed remedies from plants with or without a medical prescription. This represents a danger, when unknown chemical composition of the plant and possible drug interactions, and even more if its effect has not been studied and validated. *Eryngium carlinae*, commonly known as "hierba del sapo", is a plant used in traditional medicine for diabetic people to control their levels blood glucose and cholesterol; however, to date no studies that validate its effect are available. Therefore, our interest was to analyze the chemical composition of the ethanol extract of *E. carlinae* and study the effect of its consumption. This study hypothesizes that *E. carlinae* may have hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activity that may provide a benefit to people with diabetes. To test the hypothesis in this study was evaluated the effect of consumption of ethanolic extract of *E. carlinae* in streptozitacin (STZ)-diabetic rats. Indicators were analyzed of blood glucose levels, lipids levels and cardiovascular risk as well antioxidant activity in kidney mitochondria. Chromatographic analysis of the chemical composition of the extract was also carried out and its antioxidant effect was evaluated *in vitro*. The results showed that the ethanolic extract of *E. carlinae* has no hypoglycemic effect when administered orally to STZ-diabetic rats (45 mg/kg), however, it did reduce cholesterol and triacylglycerol levels with this improving the lipid profile and reducing cardiovascular risk index. Analysis *in vitro* showed antioxidant activity a considerable amounts of flavonoids and phenolic compounds, related to antioxidant activity; however, in the *in vivo* analysis, the extract did not have a significant effect on the measurements of lipoperoxidation, antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, only showed an effect of reducing the nitric oxide levels. In histological studies of kidney was observed that cell from rats treated with the extract of *E. carlinae* have fewer structural alterations than diabetics kidney. Therefore we concluded that although the extract of *E. carlinae* did not control the hyperglycemia, it may offer benefits on lipid profile and

progression of renal damage, so it may be consumed on par with a drug that controls blood sugar.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un grave problema de salud mundial, se estima que en el mundo hay 371 millones de personas con DM, de los cuales 50% no han sido diagnosticados. Se espera que la cifra aumente a más de 552 millones de diabéticos para el 2030 [1]. Según datos de la Federación Internacional de Diabetes [1], en México la prevalencia de este padecimiento es del 15.59% y ocupa el primer lugar en número de defunciones por año [2].

3.1.1 Definición, clasificación y diagnóstico

La OMS define a la DM como un trastorno metabólico, de etiología múltiple, caracterizado por hiperglucemia crónica, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, resultado de una deficiencia absoluta o relativa en la secreción y/o acción de la insulina o ambos [3]. Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, polifagia y visión borrosa. También puede observarse deterioro del crecimiento y susceptibilidad a ciertas infecciones [4].

La DM puede clasificarse en: 1) DM tipo I, causada por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina; 2) DM tipo II, que va desde una predominante resistencia a la insulina con relativa deficiencia de insulina hasta derivar en un defecto predominante en la secreción de la insulina con resistencia a la misma; 3) otros tipos específicos de diabetes, que incluyen los defectos genéticos en las células β , endocrinopatías, diabetes inducida por fármacos o químicos, entre otras; 4) la DM gestacional, la cual generalmente se resuelve al término del embarazo pero en algunos casos la condición persiste [4]. Debe resultar menos importante el tratar de “etiquetar” al paciente en un tipo específico de diabetes, lo importante es entender la patogénesis de la hiperglucemia y tratarla eficazmente.

Los criterios que establece el Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*) para el diagnóstico de la DM son: a) niveles de glucosa en plasma en ayunas ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l), b) el diagnóstico debe ser confirmado por determinación de glucosa postprandial 2h la cual debe ser ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l). Recientemente se ha aprobado la

determinación del porcentaje de hemoglobina glucosilada (A1c) como herramienta en el diagnóstico de la DM, estableciendo el punto de corte en 6.5% [4].

Las complicaciones de la DM suelen clasificarse en macrovasculares y microvasculares, ambas se presentan en la mayoría de los diabéticos tanto tipo I como tipo II, junto a estas complicaciones se encuentra el estrés oxidativo; el desarrollo de estas anomalías parece tener como factor común y desencadenante la hiperglucemia crónica.

3.1.2 Las complicaciones macrovasculares y la dislipidemia diabética

Se estima que en México entre 7 y 8 de cada 10 personas con diabetes mueren por un problema macrovascular [5]. Entre las principales complicaciones macrovasculares que presentan los diabéticos se encuentran: la enfermedad cardiovascular, que resulta en infarto al miocardio y la enfermedad cerebrovascular, que se manifiesta como ataque cerebral [6], además, presentan una mayor frecuencia de enfermedades cardiovasculares relacionadas con la aterosclerosis como insuficiencia cardíaca, insuficiencia cerebral vascular e insuficiencia arterial periférica dependiendo de la localización del bloqueo de las arterias [4,7].

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias musculares de medio y grueso calibre, se caracteriza por disfunción endotelial, inflamación vascular, acumulación de lípidos (como colesterol), calcio y restos celulares dentro de la íntima de las paredes de los vasos sanguíneos, lo que conduce a la formación de la placa aterosclerótica, a la remodelación de la vasculatura, a la obstrucción luminal crónica o aguda, a anomalías en el flujo sanguíneo y a un aporte de oxígeno comprometido en los tejidos blanco [7].

Es frecuente que los pacientes diabéticos presenten la aparición combinada de hiperglucemia y dislipidemia [4, 8]. La dislipidemia diabética engloba un conjunto de anomalías en las lipoproteínas y lípidos potencialmente aterogénicos [9]. Estas anomalías incluyen niveles elevados de triacilglicéridos (TAG) en plasma, baja concentración de colesterol en lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), predominio de pequeñas y densas partículas de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y excesiva lipemia postprandial. Se ha demostrado que una reducción en el C-LDL reduce el riesgo cardiovascular [10].

3.1.2.1 Las alteraciones en el metabolismo y transporte de lípidos en la diabetes

Los principales lípidos de la sangre son el colesterol y los TAG, ambos lípidos son esenciales ya que tienen funciones importantes en el organismo. El colesterol forma parte de las membranas celulares, es precursor de hormonas esteroideas, vitamina D y sales biliares. Los ácidos grasos producidos por la degradación de TAG, tienen funciones estructurales y como precursores de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Los niveles de lípidos circulantes (colesterol y TAG) dependen de la cantidad de lípidos ingeridos a través de la dieta, de la síntesis interna y de la cantidad que se excreta diariamente a través de las heces.

Los lípidos provenientes de los alimentos deben ser degradados por las lipasas (gástrica y pancreática) para poder ser absorbidos por los enterocitos en el intestino (Fig. 1) [11].

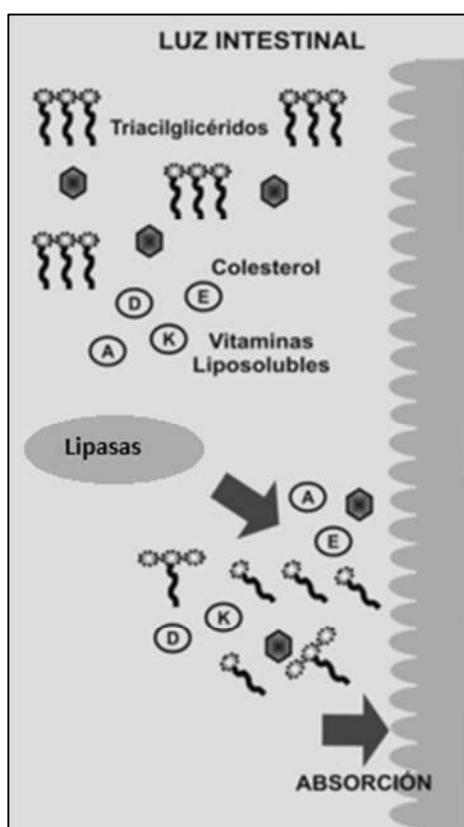


Fig. 1. Digestión y absorción intestinal de lípidos. Las lipasas gástrica y pancreática actúan sobre los triacilglicéridos degradándolos y convirtiéndolos en diacil y monoacilglicéridos, lo que los hace absorbibles por los enterocitos. Tomada y modificada de Valdemar *et al.* [11].

El colesterol proveniente de la dieta es absorbido por el intestino y junto con los TAG y fosfolípidos, debido a su naturaleza hidrofóbica, deben ser transportados en los líquidos corporales unidos a proteínas, en forma de agregados macromoleculares denominados lipoproteínas [12].

Las lipoproteínas se clasifican en cinco tipos atendiendo a su densidad, la cual depende de su relación lípido/proteína, de menor a mayor densidad se tienen: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y HDL. Las células las reconocen mediante receptores específicos de membrana gracias a su contenido de apoproteínas (Apo) de las cuales se han caracterizado varios tipos: Apo-A: I, II y III, Apo-B: B-48 y B-100, Apo-C: I, II, III, Apo-D, Apo-E, Apo-F y Apo-G [12].

Los quilomicrones son las lipoproteínas que transportan a los lípidos exógenos desde el intestino hasta los tejidos periféricos; las VLDL tienen una función muy parecida pero para lípidos endógenos sintetizados en el hígado. Ambas lipoproteínas tienen en su estructura un elevado contenido de TAG los cuales se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos en la superficie interna de los capilares de los tejidos periféricos, por acción de la lipoproteína lipasa (LPL) [12]. A partir de las VLDL se obtienen las IDL y los quilomicrones se transforman en quilomicrones remanentes. La Apo B100 se utiliza para la síntesis de LDL a partir de la IDL, siendo estas lipoproteínas las que transportan el colesterol a los tejidos periféricos, de ahí su nombre coloquial de “colesterol malo”. Las HDL en cambio, eliminan el exceso de colesterol de los tejidos periféricos y lo devuelven al hígado para su metabolismo o excreción, por tal motivo, al colesterol de éstas lipoproteínas lo llaman “colesterol bueno” (Fig.2) [12].

Bajo condiciones normales, el ser humano es capaz de movilizar y excretar el colesterol y otros lípidos por un proceso llamado transporte reverso de colesterol (TRC), lo cual previene la aterosclerosis [13]. Esta vía se encarga de llevar el colesterol remanente desde los tejidos periféricos hacia el hígado para su reutilización o eliminación a través de la bilis evitando así su acumulación en los tejidos [14]. El TRC puede evaluarse mediante dos parámetros que cuantifican indirectamente a las HDL: a través de la Apo AI, su proteína mayoritaria, o por su contenido de colesterol (C-HDL) [14].

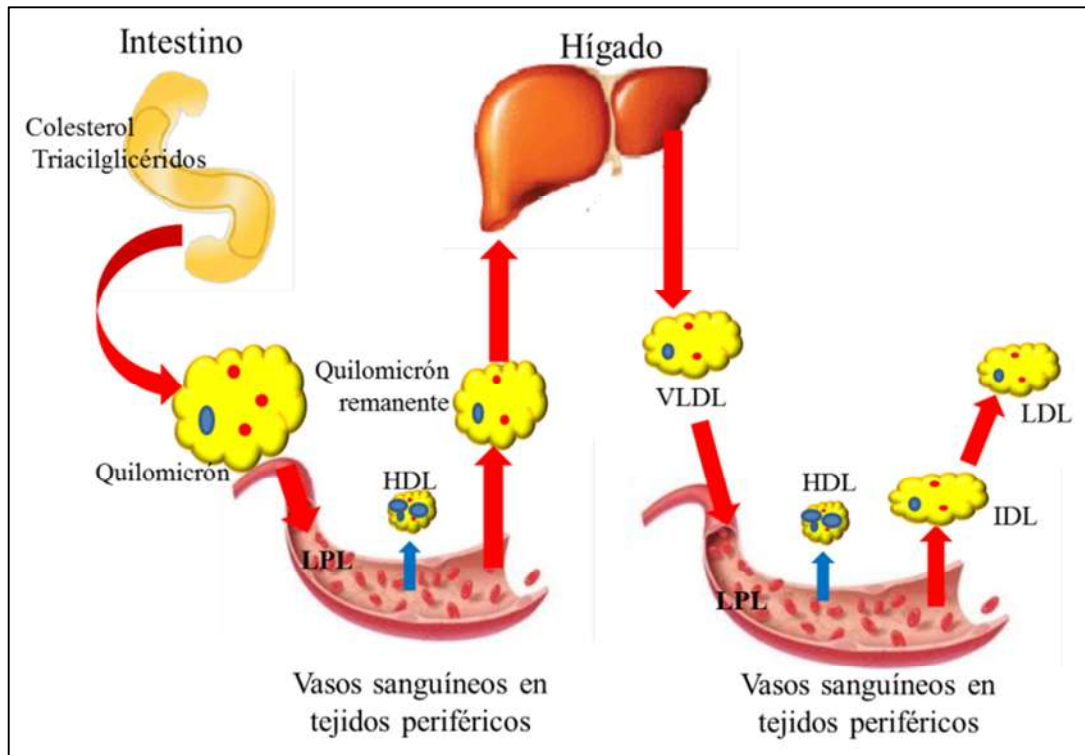


Fig. 2. Transporte de lípidos exógenos y endógenos por las lipoproteínas. Los ácidos grasos y monoacilglicéridos obtenidos de la digestión de TAG presentes en las células del endotelio intestinal se condensan para formar TAG que son empaquetados junto con proteínas, fosfolípidos, colesterol y vitaminas liposolubles en quilomicrones los cuales son secretados a la circulación linfática y posteriormente a la sangre. Los TAG de los quilomicrones son degradados por la (lipoproteína lipasa) LPL presentes en membranas basales de las células endoteliales que recubren los capilares sanguíneos liberando ácidos grasos para la utilización en los diferentes tejidos y convirtiéndose en quilomicrones remanentes son captados para el hígado y su contenido utilizado. Cuando se exceden las necesidades energéticas del hígado, el exceso se convierte en TAG que son empaquetados en VLDL, junto con colesterol libre y esterificado, fosfolípidos y apoproteínas, posteriormente son secretadas a la circulación sanguínea y llegan a los capilares presentes en los diferentes tejidos en donde la LPL activa degrada los TAG, quedando partículas con gran contenido de colesterol libre y esterificado, las IDL y LDL. El colesterol captado por las HDL puede dirigirse hacia el hígado para su eliminación por la bilis. Tomado y modificado de Davidson y Jacobson [14a].

Se distinguen cuatro etapas en el transporte reverso de colesterol: el eflujo del colesterol libre hacia el espacio extracelular, su esterificación, la transferencia del colesterol esterificado hacia lipoproteínas que contienen Apo B y por último, la captación hepática de

colesterol. El aumento en los niveles de TAG puede alterar algunas etapas del TRC [14], disminuyendo por lo tanto su efecto protector.

Es importante señalar que casi todo el colesterol endógeno se sintetiza en el hígado a partir de acetil-CoA [12], que pasa a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), el cual se reduce a mevalonato por acción de una reductasa dependiente de NADPH, la HMG-CoA reductasa, esta reacción es el paso limitante y regulador de biosíntesis de colesterol [12]. En este nivel actúan las estatinas, fármacos empleados para controlar los niveles plasmáticos de colesterol, suprimen la actividad de la HMG-CoA reductasa, reduciendo la biosíntesis de colesterol y por lo tanto, los niveles plasmáticos del mismo.

La biosíntesis de colesterol se ve modificada por varios factores. El aumento en los niveles de colesterol proveniente de la dieta disminuyen la síntesis y actividad de la enzima HMG-CoA reductasa hepática, por lo tanto disminuye la biosíntesis de colesterol. También se ve disminuida como consecuencia del efecto que ejercen los niveles intracelulares elevados de colesterol sobre la síntesis y expresión del receptor celular para las LDL (LDL-r) que se ven disminuidos y bloquean la incorporación de colesterol desde proteínas plasmáticas [12]. Por otra parte, el exceso de grasas de la dieta, en particular de ácidos grasos saturados, elevan los niveles de acetil-CoA en el hepatocito aumentando la biosíntesis de colesterol [12].

Por otra parte, la carencia de insulina en el organismo diabético, ya sea por falta de secreción de insulina o por la resistencia a la misma, trae como consecuencia alteraciones en el metabolismo de los lípidos. La deficiencia de insulina causa una disminución de la lipoproteína lipasa (LPL) por lo que disminuye la hidrólisis de TAG de los quilomicrones y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y por lo tanto no hay liberación de éstos hacia el tejido muscular y adiposo [15], lo que a su vez aumenta la lipólisis en adipocitos.

El exceso de ácidos grasos libres observado en pacientes diabéticos, provoca un incremento en la gluconeogénesis hepática y en los músculos, el metabolismo cambia de utilizar glucosa a utilizar lípidos, hay lipotoxicidad en las células β del páncreas por la acumulación de lípidos, y se presenta la clásica triada lipídica (elevación de TAG y C-LDL, y disminución de C-HDL) sin hipercolesterolemia real [8].

Se debe considerar la influencia recíproca de la dislipidemia sobre la función de las células β y a su vez, de la disfunción de las células β sobre el metabolismo de los lípidos y las

complicaciones micro y macrovasculares [8], para poder ofrecer a los pacientes diabéticos un tratamiento integral y a su vez para plantear mejores estrategias de prevención ya que los tratamientos actuales sólo ralentizan la progresión de la enfermedad [6] sin curarla.

3.1.3 Las complicaciones microvasculares y la nefropatía diabética

Entre las complicaciones microvasculares más frecuentes que se presentan en los diabéticos se encuentran la nefropatía, la retinopatía y la neuropatía periférica con desenlace en amputaciones [6].

La nefropatía diabética es una de las complicaciones microvasculares más severas y la principal causa de falla renal terminal [16]. Se caracteriza por el desarrollo de proteinuria con una subsiguiente disminución de la tasa de filtración glomerular y evoluciona durante un largo período de tiempo, a menudo más de 10-20 años [6]. El desarrollo y progresión de la nefropatía es altamente compleja dada la diversidad de poblaciones celulares presentes en el riñón y las diferentes funciones fisiológicas de este órgano [6, 16].

Las alteraciones hemodinámicas, como el aumento en la tasa de filtración glomerular debido al incrementado flujo de plasma y la presión capilar glomerular [17], así como la hiperplasia e hipertrofia, son eventos que aparecen en etapas tempranas de la nefropatía [18].

Es conocido que en la patogénesis de la nefropatía diabética, ocupa un lugar importante la elevada generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) causada por la hiperglucemia y el consecuente estrés oxidativo [19]. El mecanismo que relaciona la hiperglucemia con el estrés oxidativo y la nefropatía diabética no es completamente conocido. Estudios muestran que el estrés oxidativo puede afectar los ácidos nucleicos y desencadenar procesos de muerte celular por apoptosis en los podocitos, también se ha reportado la elevación de enzimas antioxidantes como la hemo oxigenasa 1 para reducir la apoptosis de los podocitos bajo condiciones diabéticas [19].

3.1.3.1 La hiperglucemia y el estrés oxidativo en la diabetes

La hiperglucemia puede estimular la generación de ERO a través de diferentes fuentes tales como la fosforilación oxidativa, auto oxidación de glucosa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, entre otros, aunque es dentro de la mitocondria donde se ubica la principal fuente

generadora de ERO, la cadena transportadora de electrones, la cual produce el anión superóxido (O_2^-) debido a la reducción parcial del oxígeno [20]. La DM no sólo estimula la generación de ERO, sino que también deteriora la habilidad de las células para hacer frente al aumento de ERO al afectar muchos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos son afectados [20]. Ambas situaciones dan lugar a la condición conocida como estrés oxidativo, situación que se genera por la sobreproducción de ERO y la disminución de las defensas antioxidantes de las células. Las ERO oxidan y alteran la estructura y función de las proteínas y pueden activar las vías de señalización a través de la proteína cinasa C (PKC) y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (FN- κ B) [20].

Los niveles elevados de glucosa en la diabetes producen aniones superóxido y radicales hidroxilo (\cdot OH) en presencia de metales de transición lo que causa daño oxidativo en los lípidos de las membranas celulares, sin embargo, el grado del daño parece ser tejido específico, siendo más susceptible el tejido cardiaco que el tejido hepático o el tejido renal [21]. El efecto dañino del O_2^- y \cdot OH causantes del estrés oxidativo puede ser contrarrestado por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Se ha observado un aumento en estas enzimas antioxidantes como posible mecanismo de respuesta en etapas tempranas de la DM [21], mientras que los antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas E y C, se han observado disminuidos en el plasma de pacientes con DM [22].

El óxido nítrico (NO), producido por la óxido nítrico sintasa (NOS), también está asociado con varios desordenes en la DM. En los sistemas biológicos donde se conjuntan la generación de varias especies reactivas, se da una interacción, como en el caso del O^- y el NO, dando lugar a la formación de especies reactivas aún más dañinas como el peroxinitrito. Se ha reportado que en riñones de ratas diabéticas inducidas con alloxan hay un aumento en los niveles de productos finales del metabolismo del NO, los nitritos y nitratos [23].

3.2 Estudio de las plantas empleadas en la medicina tradicional

Desde hace algunos años se ha hecho evidente el interés por estudiar y constatar los efectos de las plantas empleadas en la medicina tradicional, a pesar de esto, la gran mayoría no han sido estudiadas, posiblemente debido a la gran diversidad de plantas empleadas y a la variedad de usos y propiedades que se le pueden atribuir a cada una de ellas.

Entre los objetivos del estudiar las plantas empleadas en la medicina tradicional se encuentra el comprobar su eficacia y la seguridad en su consumo. Muchas plantas han sido estudiadas y los resultados publicados muestran si realmente tienen eficacia, además de los aspectos de seguridad de las plantas más frecuentemente utilizados son ahora bien conocidos. Las contraindicaciones de algunas plantas por sus interacciones con fármacos también se están conociendo, pero esto no está disponible para todas [24].

Muchas plantas empleadas en la medicina tradicional por las personas diabéticas han sido estudiadas y su efecto comprobado como en el caso de las siguientes: *Capparis decidua*, que tiene actividad hipoglicémica y antioxidante en ratas diabéticas inducidas con alloxan [21], *Zaleya decandra* que también tiene actividad hipoglicémica en ratas diabéticas inducidas con alloxan [25] y de *Orostachys japonicus* que tiene efectos hipolipidémicos e hipoglicémicos en ratas diabéticas inducidas con STZ [26], sólo por mencionar algunas. Los efectos que las plantas pueden mostrar dependen del modelo de diabetes en que se prueben, la preparación y el período por el que sean administradas, la vía de administración empleada, entre otros factores. En México se han documentado al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias usadas como agentes hipoglucemiantes, entre las que sobresalen las familias Asteraceae (47 especies), Fabaceae (27 especies) Cactaceae (16 especies), Solanaceae y Euphorbiaceae (10 especies) y Laminaceae (9 especies), sin embargo estudios etnobotánicos sugieren subestimada la cantidad de especies documentada y estiman que son cerca de 500 especies las empleadas para tratar la DM en nuestro país [26a].

3.2.1 Compuestos de interés biológico presentes en las plantas

Las plantas vasculares sintetizan una gran cantidad de moléculas orgánicas, como consecuencia de su metabolismo secundario. Entre los principales metabolitos secundarios con efecto terapéutico se encuentran los aceites esenciales, taninos, ácidos fenólicos, sesquiterpenolactonas, cetonas y flavonoides [27].

Los fenoles son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La característica antioxidante de los fenoles se debe precisamente a la reactividad del grupo fenol [28]. Los flavonoides son polifenoles que poseen dos subunidades fenólicas; los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos [28]. Los flavonoides y otros

polifenoles tienen poderosas propiedades antioxidantes *in vitro*, siendo capaces de eliminar un amplio espectro de especies reactivas, incluyendo los radicales hidroxilo y O[•]. Además inhiben el daño biomolecular por peroxinitrito *in vitro*. Muchos flavonoides quelan metales de transición disminuyendo con esto la formación de ERO [29]. Se ha reportado que los flavonoides con un H en la posición C-3, tienen efecto inhibitorio contra la aldolasa reductasa, lo cual es considerado como efecto hipoglucémico. Esta actividad se basa en su habilidad para establecer un enlace entre un H del compuesto y su blanco. Se ha reportado que la estructura de flavona de los flavonoides posee actividad anti-diabética [26].

Los compuestos fitoquímicos proporcionan protección contra los efectos dañinos de los radicales libres y también pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, ateroscleróticas e inflamación asociadas con el estrés oxidativo [29a].

3.3 *Eryngium carlinae*

Recientemente se elaboró un listado de las especies de plantas más importantes y con gran potencial medicinal que habitan en la localidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro, una región con gran uso de plantas en la medicina tradicional. Ese trabajo incluyó 90 especies, 63 géneros y 33 familias, de ahí fueron seleccionadas 20 especies por ser las más utilizadas, las cuales se sometieron a un programa de propagación, cultivo y caracterización química de sus extractos [30]. Una de las plantas seleccionadas para el proceso fue *Eryngium carlinae*.

E. carlinae es una planta perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae), es perenne, por lo general baja, de 5 a 50 cm de alto, raíz pivotante, con uno o varios tallos, tiene hojas basales en forma de roseta densa, con inflorescencia cimosa en ocasiones repetidamente ramificada, tiene cabezuelas pedunculadas de color azul, violeta o blancas y ovoides con pétalos espatulados, de alrededor de 1 mm de largo (Fig. 3) [30]. Crece de manera arvense, ruderal y en claros donde ha sido derribada la vegetación original. Se encuentra en bosques de oyamel, pino, pino-encino, laderas y barrancas, suelos profundos y ricos en materia orgánica, se distribuye de 2020-2590 msnm [30]. Entre los usos que se le da en la medicina tradicional encontramos que la parte aérea de la planta se usa para preparar un té para tratar congestión del pecho y tos, padecimientos gastrointestinales, enfermedades de la próstata, desórdenes de lípidos y DM. Se le han atribuido propiedades curativas y diuréticas a extractos de la planta

[30]. También es usada en lavados vaginales, para tratar punzadas en el oído e inflamaciones por golpes [31]. Otras especies de *Eryngium* (*Eryngium columnare*) han sido usadas para tratar enfermedades del riñón, diarrea, alergías, tos y cáncer [30].

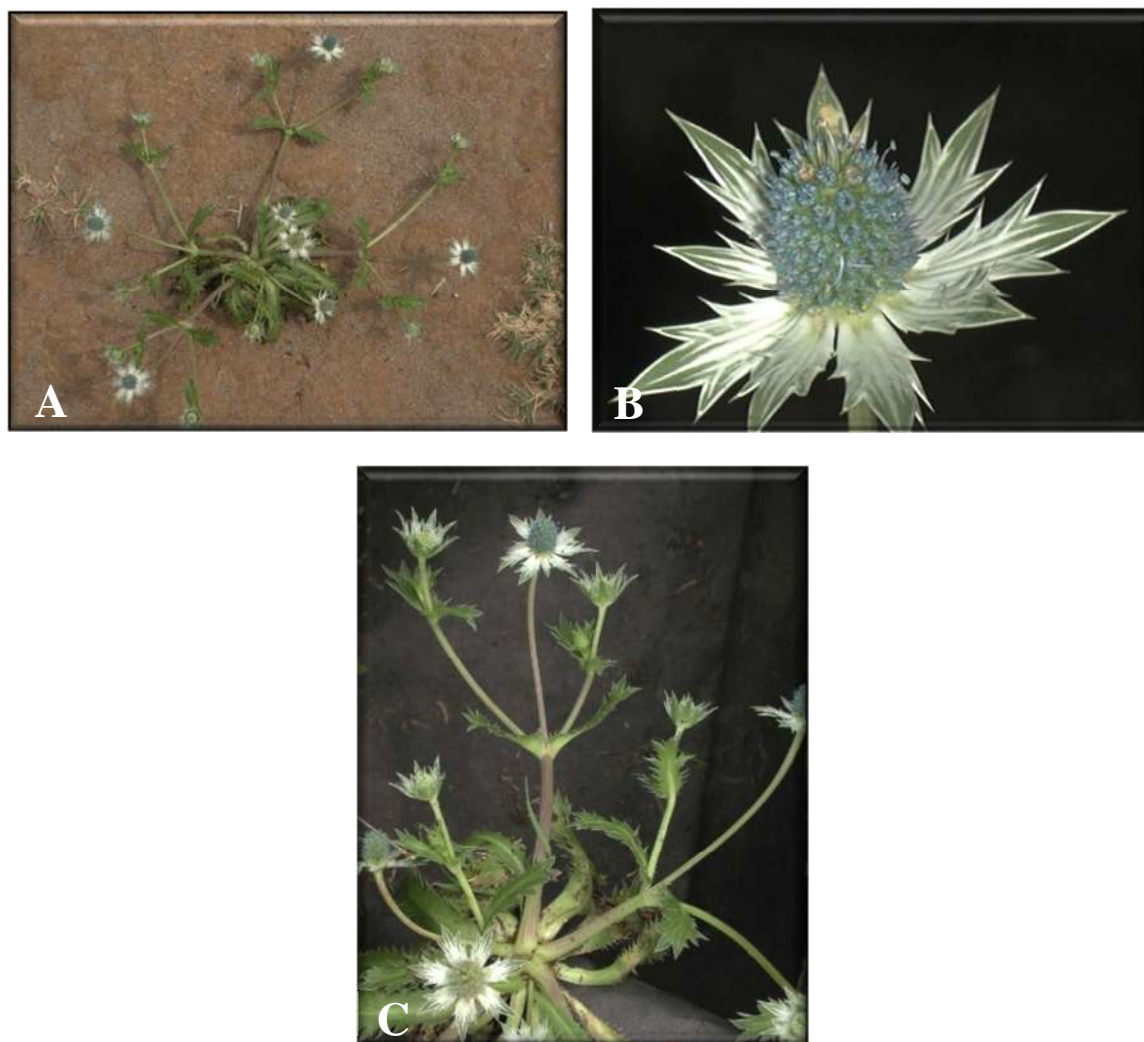


Fig. 3. Plantas de *Eryngium carlinae*. (A) Planta de *E. carlinae* que presenta hojas basales en forma de roseta densa. (B) Inflorescencia ovoide de *E. carlinae* de color azul-violeta con pétalos espatulados de alrededor de 1 mm. (C) Parte aérea de *E. carlinae* con cabezuelas en color azul-violeta (www.discoverlife.org/mp/20q?search=Eryngium+carlinae).

Los únicos estudios realizados con el extracto etanólico de *E. carlinae* han demostrado que posee propiedades antimicrobianas, inhibiendo hasta un 60% el crecimiento de bacterias

(*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) y entre un 35 a 100% el crecimiento de hongos como *Candida albicans*, *Mucor circinelloides* y *Sporothrix schenckii* [30]. Los terpenos identificados como α -pineno y α -humuleno podrían ser los metabolitos potenciales responsables del efecto antimicrobiano.

4. JUSTIFICACIÓN

Dada la implicación de la hiperglucemia, las dislipidemias y el estrés oxidativo como factores de las complicaciones de la diabetes, es necesario el estudio y evaluación del potencial hipoglucémico, hipolipidémico y antioxidante de las plantas empleadas en la medicina tradicional para tratar la diabetes. *Eryngium carlinae* es una planta con amplio uso en Michoacán y que puede tener potencial terapéutico para tratar las complicaciones de la diabetes representado una alternativa para su tratamiento, por lo que es importante realizar estudios que conduzcan a determinar las propiedades hipoglucémicas, hipolipidémicas y antioxidantes de esta planta.

5. HIPÓTESIS

El extractos etanólico de *Eryngium carlinae* tienen actividad hipoglucémica, hipolipidémica y antioxidante en ratas diabéticas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la capacidad hipoglucémica, hipolipidémica y antioxidante del extracto etanólico de *Eryngium carlinae*, y analizar el posible mecanismo de acción en ratas diabéticas.

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto hipoglucémico e hipolipidémico del extracto etanólico de *E. carlinae* en ratas diabéticas.
- Determinar los principales compuestos presentes en el extracto etanólico de *E. carlinae* y determinar la fracción con mayor actividad hipoglucémica e hipolipidémica.
- Evaluar el efecto antioxidante del extracto etanólico de *E. carlinae* *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el mecanismo de acción por el cual *E. carlinae* ejerce su efecto.

7. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se presentan divididos en tres capítulos. El capítulo uno corresponde a las primeras determinaciones realizadas con el objetivo de evaluar de manera general el efecto hipoglucémico e hipolipidémico del extracto etanólico de *E. carlinae* empleando ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Con los resultados obtenidos en ésta primera parte se publicó el artículo: Hypolipidemic Activity of *Eryngium carlinae* on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 2012. Noriega-Cisneros R, Ortiz-Ávila O, Esquivel-Gutiérrez E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Salgado-Garciglia R, Cortés-Rojo C, Boldogh I, Saavedra-Molina A. *Biochem Res Int* 2012:603501.

El capítulo dos corresponde a un estudio más específico para determinar el mecanismo a través del cual el extracto ejercía su efecto hipolipidémico empleando para ello mediciones específicas que indicaron el nivel de acción del extracto etanólico de *E. carlinae* y permitieron sugerir un mecanismo de acción. También en éste capítulo se muestran los resultados del empleo de una de las fracciones del extracto etanólico de *E. carlinae*, así como los resultados del análisis cromatográfico donde se muestran identificados los compuestos mayoritarios.

El capítulo tres muestra los resultados del análisis realizado para evaluar la actividad antioxidante del extracto etanólico de *E. carlinae* y es comparado desde varias perspectivas. Por una parte se compara su capacidad antioxidante *in vitro* con la de otros extractos etanólicos y acuosos de *E. carlinae*. Posteriormente se evalúa *in vivo* la capacidad antioxidante del extracto empleando uno de los principales órganos afectados por el estrés oxidativo en la diabetes.

Capítulo 1

Actividad hipolipidémica de *Eryngium carlinae* en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

Resumen

La diabetes mellitus (DM) es un factor de riesgo importante para el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares. Este estudio fue realizado para investigar el efecto de la administración crónica del extracto etanólico de *Eryngium carlinae* sobre los niveles de glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total y triacilglicéridos en el suero de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). Los niveles de glucosa, ácido úrico, colesterol total y triacilglicéridos incrementaron en el grupo de ratas diabéticas. El tratamiento con el extracto de *E. carlinae* disminuyó los niveles de creatinina, ácido úrico, colesterol total y triacilglicéridos. Con lo que se concluye que el consumo del extracto de *E. carlinae* es capaz de reducir la hiperlipidemia relacionada con las complicaciones cardiovasculares durante la DM.

Research Article

Hypolipidemic Activity of *Eryngium carlinae* on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Ruth Noriega-Cisneros,¹ Omar Ortiz-Ávila,¹ Edgar Esquivel-Gutiérrez,¹
Mónica Clemente-Guerrero,¹ Salvador Manzo-Avalos,¹ Rafael Salgado-Garciglia,¹
Christian Cortés-Rojo,¹ Istvan Boldogh,² and Alfredo Saavedra-Molina^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

²Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX 77555, USA

Correspondence should be addressed to Alfredo Saavedra-Molina, saavedra@umich.mx

Received 19 July 2011; Revised 13 September 2011; Accepted 23 September 2011

Academic Editor: Paul Denny

Copyright © 2012 Ruth Noriega-Cisneros et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Diabetes mellitus (DM) is a significant risk factor for the development of cardiovascular complications. This study was undertaken to investigate the effect of chronic administration of ethanolic extract of *Eryngium carlinae* on glucose, creatinine, uric acid, total cholesterol, and triglycerides levels in serum of streptozotocin- (STZ-) induced diabetic rats. Triglycerides, total cholesterol, and uric acid levels increased in serum from diabetic rats. The treatment with *E. carlinae* prevented these changes. The administration of *E. carlinae* extract reduced the levels of creatinine, uric acid, total cholesterol, and triglycerides. Thus administration of *E. carlinae* is able to reduce hyperlipidemia related to the cardiovascular risk in diabetes mellitus.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) describes a metabolic disorder of multiple etiologies characterized by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat, and protein metabolism resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both [1]. The effects of DM include long-term damage, dysfunction, and failure of various organs. Diabetic people present a 2–4-fold higher risk of developing cardiovascular disease than normoglycemic population of similar age and sex. The cardiovascular complications attributable to atherosclerosis are responsible for 70–80% of all causes of death in patients with diabetes and represent more than 75% of all hospitalizations for diabetic complications [2]. The primary goal of diabetes treatment is the prevention of macrovascular complications (myocardial infarction, heart failure, ischemic stroke), as well as the microvascular complications (retinopathy, neuropathy, and nephropathy); for that reason, most patients require not only a good glycemic control but also treatment for dyslipidemia [3]. Dyslipidemia (disruption in the normal levels of lipids, mainly cholesterol

and triglycerides) is considered a major cardiovascular risk factor in diabetes [2]. Therefore, the detection of dyslipidemia and its treatment to reduce the cardiovascular risk and its consequences are required in diabetic patients.

The growing need to find alternatives for the treatment of diabetes justifies the study of medicinal plants used in traditional medicine. There are several reports about the beneficial effects of a wide range of plants to treat diabetes. Hypoglycemic effect was observed in extracts of plants such as *Amaranthus viridis* [4] and *Psidium guajava* [5] whose effects are almost comparable with the synthetic drug tolbutamide, while *Zaleya decandra* [6] has effects equivalent to glibenclamide. Other plants also appear to exert their beneficial effects by improving the dyslipidemia and oxidative stress that characterize diabetes. For example, *Morus indica* L. [7] decreases LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol level and increases HDL-cholesterol levels, while *Phyllanthus amarus* [8] improves antioxidant status and reduces the risk of oxidative stress.

In México, the use of plants for diabetes treatment is generally carried out in an empirical basis. In this regard, it seems

that many plants for diabetes treatment were originally used for a variety of kidney disorders and most notably for their diuretic effect [9]. This study was conducted to analyze the effect of chronic administration of ethanolic extract of *E. carlinae* in diabetic rats. This plant has often used in traditional medicine to treat diabetes; however there are no studies indicating the effects of its consumption. *Eryngium carlinae* F. Delaroche is a perennial herb plant considered a weed belonging to the family Umbelliferae. It is distributed in forests of fir, pine and pine-oak hillsides, and canyons, deep soils rich in organic matter. It is distributed from 2020–2590 meters above sea level. It is commonly known as “Frog herb”. Decoctions of the aerial parts of the plant are used to treat coughs, indigestion, diseases of the prostate, lipid disorders, and diabetes [10]. It has been attributed healing and diuretic properties to extracts from the plant. Other species of *Eryngium* (*Eryngium columnare*) have been used to treat kidney disease, diarrhea, allergy, cough, and cancer [10].

2. Results

Therefore, the aim of this research was to determine the effect of chronic oral administration of ethanolic extract of *E. carlinae* on some biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats.

3. Materials and Methods

3.1. Vegetal Material. Plant samples of *Eryngium carlinae* F. Delaroche were collected in September and October, 2008, in the region of Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. The plant was identified by Miguel Angel Bello-González PhD (Faculty of Agrobiology, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) genus and species preserving. A voucher specimen was deposited at the Biology Faculty Herbarium of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (no. 15214). The aerial part of the plant was dried at room temperature and pulverized.

3.2. Extract Preparation. Ethanolic extract of the plant was prepared by adding 1,000 mL of absolute ethanol to 100 g of plant powder and kept at 5°C for five days. The extract was then filtered, concentrated in a rotary evaporator at vacuum and at a temperature lower than 50°C, evaporated at room temperature, suspended in ethanol 96%, and stored in the dark at 5°C. The percentage yield of the dry residue was 1.27% w/w.

3.3. Animals. Male Wistar rats weighing 280–360 g were used. They were housed and maintained at room temperature with day/night cycles of 12 h. They were fed with standard rodent diet and water *ad libitum*. We followed the recommendations of the regulatory standard for the use of animals issued by the Mexican Ministry of Agriculture in the paragraph of the Federal Regulations for the Use and Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999). This research was also approved by the Institutional Committee for Use of Animals of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

3.4. Diabetes Induction. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of STZ (45 mg/kg of body weight) dissolved in citrate buffer (pH 4.5). Control rats were injected with citrate buffer alone. Five days after streptozotocin administration, the glucose levels were determined to confirm diabetes. Rats exhibiting blood glucose levels >300 mg/dL were considered for the study.

3.5. Experimental Protocol. Rats were randomly divided into four groups of six rats. Group I, control (vehicle, ethanol 50%), Group II, control + *E. carlinae* (30 mg/kg of body weight), Group III, diabetic (vehicle, ethanol 50%), Group IV, diabetic + *E. carlinae* (30 mg/kg of body weight). The extract was given by oral administration using oral gavage. The treatment was continued daily for 40 days.

3.6. Effects of *E. Carlinae* on Glycemia and Body Weight. Glucose estimation was started just before extract administration and followed every 5 days using a commercial glucometer (Accu-Check Sensor III Glucometer) through a puncture in the tail tip, and animal weight was recorded at a time during the 40 days.

3.7. Effects of *E. Carlinae* on Hematological and Biochemical Parameters. At 40 days of treatment, the animals were fasted overnight and sacrificed by decapitation. The blood was collected, and serum was separated and used for biochemical estimations. The levels of glucose, creatinine, uric acid, total cholesterol, and triglycerides were estimated spectrophotometrically using a commercial assay kit (BioSystems, Spain). Glucose was determined measuring enzymatic oxidation catalyzed through the Trinder reaction [11]. Creatinine was determined by a kinetic method without deproteinization as reported by Junge et al. [12]. Uric acid was determined by an enzymatic photometric method using TBHBA (2, 4, 6-tri-bromide-3-hydroxybenzoic acid). Total cholesterol was determined measuring the enzymatic hydrolysis and oxidation with the Trinder reaction [13]. Triglycerides were determined by an enzymatic colorimetric method using glycerol-3-phosphate oxidase [14]. Whole blood samples were used for hemoglobin (Golden Bell, México) and glycosylated hemoglobin (DiaSys, Germany) determinations using commercial assay kits.

3.8. Statistical Analysis. The results were expressed as the mean ± Standard Error (SE) of at least six independent experiments. Statistical significances ($P \leq 0.05$) were determined with Student's *t*-test using GraphPad Prism 5 software.

Changes in the body weight of the rats are presented in Table 1. In control groups, the extract did not alter the body weight gain as this parameter increased 31% and 29% at the end of the treatment in both control and control + *E. carlinae* groups, respectively, compared to their initial body weight. Similarly, no differences in body weight were detected between diabetic and diabetic + *E. carlinae* groups throughout the study.

TABLE 1: Effect of *E. carlinae* on body weight and blood glucose.

| Groups | Body weight (g) | | Blood glucose (mg/dL) | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|----------|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|
| | Initial | Final | Day | | | | | | | | | |
| | (day 0) | (day 40) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | |
| Control | 349 ± 4 | 456 ± 10 | 102 ± 4 | 109 ± 13 | 92 ± 4 | 89 ± 1 | 93 ± 13 | 86 ± 4 | 90 ± 17 | 74 ± 0.0 | 82 ± 4 | |
| Control + <i>E. carlinae</i> | 317 ± 12 | 408 ± 17 | 11 ± 7 | 116 ± 10 | 97 ± 4 | 95 ± 2 | 105 ± 2 | 90 ± 4 | 94 ± 4 | 84 ± 3 | 85 ± 2 | |
| Diabetic | 307 ± 15 | 305 ± 17 | 551 ± 20* | 423 ± 16 | 411 ± 13 | 549 ± 21 | 535 ± 22 | 580 ± 15 | 538 ± 22 | 530 ± 30 | 571 ± 29 | |
| Diabetic + <i>E. carlinae</i> | 298 ± 12 | 302 ± 14 | 436 ± 16* | 372 ± 14 | 365 ± 19 | 475 ± 33 | 373 ± 24 | 410 ± 29 | 405 ± 38 | 566 ± 15 | 537 ± 27 | |

Values are mean ± SE. *P ≤ 0.05 versus control group day 0.

TABLE 2: Effect of *E. carlinae* on hemoglobin and glycosylated hemoglobin (HbA1c).

| Groups | Hemoglobin (mg/dL) | Glycosylated hemoglobin (% HbA1c) |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Control | 16 ± 0.7 | 3.32 ± 0.07 |
| Control + <i>E. carlinae</i> | 16 ± 0.1 | ND |
| Diabetic | 17 ± 0.5 | 7.48 ± 0.08* |
| Diabetic + <i>E. carlinae</i> | 16 ± 0.8 | 7.34 ± 0.04 |

Values are mean ± SE. *P ≤ 0.05 versus control group.

With regard to blood glucose levels, Table 1 shows the records taken during the 40 days of treatment with *E. carlinae*. It can be observed a significant increase in glucose levels in diabetic groups compared with controls at the beginning of treatment. Oral administration of *E. carlinae* (30 mg/kg of body weight) for 40 days showed no reduction in blood glucose.

Table 2 shows the levels of hemoglobin and glycosylated hemoglobin in the different groups. The results show that hemoglobin levels are not affected by treatment with *E. carlinae*. Glycosylated hemoglobin determinations show a significant increase in the percentage of glycosylated hemoglobin in diabetic group compared to control group, and the treatment with *E. carlinae* did not change this behavior.

Table 3 shows the levels of glucose, creatinine, uric acid, total cholesterol, and triglycerides in serum of all groups. It is important to point out that these determinations were made with animals 12 h fast. The levels of glucose, uric acid, total cholesterol, and triglycerides in serum were significantly increased in the diabetic group when compared to control group. The treatment with *E. carlinae* decreased creatinine, uric acid, total cholesterol, and triglycerides levels in serum compared with the diabetic group.

4. Discussion and Conclusions

Oral administration of the ethanolic extract of *E. carlinae* was conducted for 40 days in a concentration of 30 mg/kg of body weight. During the treatment it was observed that the control group had a weight gain corresponding to age-appropriate growth (Table 1). In contrast, the diabetic group showed no weight gain, which is characteristic of this model of diabetes, and the treatment with *E. carlinae* did not change this tendency.

Glycemic control is a priority in diabetic patients because it has relationship with a decrease in microvascular complications in diabetes [15]. In the measurements made at the

end of treatment (Table 1), there was no reduction in glucose level in the groups that received *E. carlinae*. The glycohemoglobin (HbA1) is a general term used to describe hemoglobin that has been modified by the addition of glucose through a nonenzymatic mechanism, and the HbA1c is one of those glycosides compounds in particular that reflects average blood glucose in patient 2 or 3 months before blood collection [16, 17]. According to the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), each 1% reduction in glycosylated hemoglobin (HbA1c) was associated with a 37% reduction in microvascular complications, 18% fewer myocardial infarction, and 21% fewer diabetes-related deaths [15]. The results obtained from the measurement of HbA1c (Table 2) show a clear difference between control (HbA1c 3.32%) and diabetic (HbA1c 7.48%) group. The diabetic group that received *E. carlinae* did not show significant decrease in HbA1c (HbA1c 7.34%). Based on this and the results from Table 1, we can conclude that the ethanolic extract *E. carlinae* has not hypoglycemic effect. However, it is noteworthy that many of the plants that have been reported as hypoglycemic agents are less effective in severe diabetes [18], so it may be necessary to evaluate the extract in another model of diabetes to rule out completely its possible hypoglycemic action.

Diabetes leads to renal dysfunction [19]. Measurement of creatinine can be considered as a marker of renal dysfunction. Our results suggest that the administration of *E. carlinae* in the diabetic group decreased level of creatinine (Table 3), probably by improving renal function. The complex pathogenesis for the development of diabetic nephropathy is not well understood. One factor that has been associated with renal and cardiovascular disease is serum uric acid. It has been found that level of uric acid circulating in the upper end of normal range concentration is an independent predictor for development of diabetic nephropathy, which supports the concept that uric acid may be involved in the pathogenesis of diabetic microvascular complications [20]. Uric acid level in the diabetic group is elevated compared to control group

TABLE 3: Effect of *E. carlinae* on biochemical parameters after oral administration during 40 days.

| Groups | Glucose (mg/dL) | Creatinine (mg/dL) | Uric acid (mg/dL) | Total cholesterol (mg/dL) | Triglycerides (mg/dL) |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------|
| Control | 85 ± 6 | 0.59 ± 0.02 | 1.40 ± 0.04 | 59 ± 3 | 153 ± 18 |
| Control + <i>E. carlinae</i> | 79 ± 3 | 0.56 ± 0.01 | 1.17 ± 0.26 | 54 ± 3 | 128 ± 7 |
| Diabetic | 359 ± 8* | 0.48 ± 0.06 | 2.43 ± 0.50* | 78 ± 6* | 252 ± 19* |
| Diabetic + <i>E. carlinae</i> | 376 ± 21 | 0.32 ± 0.02* | 1.10 ± 0.33* | 46 ± 6* | 115 ± 7* |

Values are mean ± SE of at least n = 6. *P ≤ 0.05 versus control group; *P ≤ 0.05 versus diabetic group.

(Table 3). Interestingly, the higher levels of uric acid in diabetic rats are diminished significantly by the administration of *E. carlinae*, which could be related to a delay in the onset of the complications of diabetes, as has been previously suggested [20]. Abnormalities in the metabolism of lipids are one of the most frequent complications in diabetes. Among the most common lipid abnormalities is the elevation of cholesterol and triglycerides. Hypertriglyceridemia has been identified as a major risk factor for cardiovascular complications [21]. Diabetic group had elevated triglycerides level compared to control group (Table 3). This increase was normalized by treatment with *E. carlinae*. With regard to total cholesterol level, the treatment with *E. carlinae* was able to reduce this level (Table 3). Based on our results we conclude that the ethanolic extract of *E. carlinae* has no hypoglycemic effect; however, by its hypolipidemic effect it could be used as an adjuvant in the treatment of diabetes. Further studies need to be done to characterize the active components of the ethanolic extract of *E. carlinae* and its mechanism of action.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to Q.E.B. Rosa Edith Zavala-Vivanco (Clinical Chemistry Laboratory, Dr. Miguel Silva General Hospital) for loan of the facilities to carry out the biochemical determinations. This work was supported by Mexican Grants from CONACYT (144250 to ASM during his sabbatical), CIC-UMSNH (2.16, ASM; 2.37, SMA). R. N-Cisneros is a CONACYT fellow.

References

- [1] World Health Organization, "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications," Report of WHO Consultation, Geneva, Switzerland, 1999.
- [2] "Diabetes mellitus and cardiovascular risk," Recommendations of the diabetes mellitus and cardiovascular diseases group of the Spanish Diabetes Society, 2009.
- [3] D. LeRoith, "Hyperglycemia, hypertension, and dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus: goals for diabetes management," *Clinical Cornerstone*, vol. 9, supplement 2, pp. S8–S16, 2009.
- [4] B. S. Ashok Kumar, K. Lakshman, K. N. Jayaveea et al., "Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats," *Experimental and Toxicologic Pathology*. In press.
- [5] P. K. Rai, D. Jaiswal, S. Mehta, and G. Watal, "Anti-hyperglycaemic potential of *Psidium guajava* raw fruit peel," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 129, no. 5, pp. 561–565, 2009.
- [6] P. Meenakshi, R. Bhuvaneshwari, M. A. Rathi et al., "Antidiabetic activity of ethanolic extract of *Zaleya decandra* in alloxan-induced diabetic rats," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 162, no. 4, pp. 1153–1159, 2010.
- [7] B. Andallu, A. Vinay Kumar, and N. Varadacharyulu, "Lipid abnormalities in streptozotocin-diabetes: amelioration by morus indica L. cv Suguna leaves," *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, vol. 29, no. 3, pp. 123–128, 2009.
- [8] R. Karuna, S. Reddy, R. Baskar, and D. Saralakumari, "Antioxidant potential of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* in rats," *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 41, no. 2, pp. 64–67, 2009.
- [9] A. Andrade-Cetto and M. Heinrich, "Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 99, no. 3, pp. 325–348, 2005.
- [10] G. M. A. Bello, *Catálogo de Plantas Medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro*, Libro Técnico no. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP, Michoacán, México, 2006.
- [11] D. Barham and P. Trinder, "An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system," *The Analyst*, vol. 97, no. 1151, pp. 142–145, 1972.
- [12] W. Junge, B. Wilke, A. Halabi, and G. Klein, "Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method," *Clinica Chimica Acta*, vol. 344, no. 1-2, pp. 137–148, 2004.
- [13] R. Deegand J. Ziegenhorn, "Kinetic enzymic method for automated determination of total cholesterol in serum," *Clinical Chemistry*, vol. 29, no. 10, pp. 1798–1802, 1983.
- [14] T. G. Cole, S. G. Klotzsch, and J. McNamara, "Measurement of triglyceride concentration," in *Handbook of Lipoprotein Testing*, N. Rifai, G. R. Warnick, and M. H. Dominiczak, Eds., pp. 115–126, AACC Press, Washington, DC, USA, 1997.
- [15] A. I. Adler, I. M. Stratton, H. A. W. Neil et al., "Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study," *British Medical Journal*, vol. 321, no. 7258, pp. 412–419, 2000.
- [16] R. Kahn, J. Hicks, M. Muller et al., "Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement: the American diabetes association, European association for the study of diabetes, international federation of clinical chemistry and laboratory medicine, and the international diabetes federation," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 9, pp. 2399–2400, 2007.
- [17] E. Álvarez-García, "HbA1c, standardization and expression of results," *Endocrinología y Nutrición*, vol. 57, no. 5, pp. 177–181, 2010.
- [18] M. Ibrahim, M. F. Ahmed, S. M. Kazim et al., "Antidiabetic activity of *Vinca rosea* extracts in alloxan-induced diabetic

- rats," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2010, Article ID 841090, 6 pages, 2010.
- [19] T. Yokozawa, N. Yamabe, H. Y. Kim et al., "Protective effects of morroniside isolated from corni fructus against renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 31, no. 7, pp. 1422–1428, 2008.
- [20] D. I. Jalal, C. J. Rivard, R. J. Johnson et al., "Serum uric acid levels predict the development of albuminuria over 6 years in patients with type 1 diabetes: findings from the coronary artery calcification in type 1 diabetes study," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 25, no. 6, pp. 1865–1869, 2010.
- [21] P. Narvekar, M. B. Diaz, A. Krones-Herzig et al., "Liver-specific loss of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor triggers systemic hyperlipidemia in mice," *Diabetes*, vol. 58, no. 5, pp. 1040–1049, 2009.

Capítulo 2

El efecto hipolipidémico de *Eryngium carlinae* observado en ratas diabéticas es comparable al de la atorvastatina pero por un mecanismo que no implica inhibición de la HMG-CoA reductasa

Resumen

Los pacientes con diabetes mellitus presentan mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas derivado de la hiperglucemia y la carencia de insulina presentan alteraciones en el metabolismo de los lípidos, reflejado como altos niveles de triacilglicéridos y colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y bajos niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) en suero. Previamente se ha reportado que el extracto etanólico de *Eryngium carlinae* es capaz de disminuir los niveles de colesterol total y triacilglicéridos (TAG) en ratas diabéticas. En este estudio se realizó un fraccionamiento y un análisis de la composición del extracto con la finalidad de identificar los posibles compuestos responsables del efecto hipolipidémico, además se realizaron determinaciones del perfil de lípidos en sangre y se analizó la actividad de la HMG-CoA reductasa y los niveles del receptor para LDL (LDL-r), lo anterior comparándolo con un fármaco hipolipidémico, la atorvastatina. Los resultados indican que el extracto etanólico de *E. carlinae* disminuye los niveles de TAG, colesterol total, colesterol no-HDL y aumenta los niveles séricos de colesterol-HDL, un efecto similar o mayor que el producido por la atorvastatina. La actividad de la HMG-CoA reductasa y los niveles del LDL-r, en ratas diabéticas no se ven modificados por el consumo del extracto, lo que indica que el efecto hipolipidémico observado no es a través de la inhibición de la biosíntesis de colesterol como lo hace la atorvastatina. Proponemos que el efecto sea a nivel de la absorción intestinal, ya que se ha reportado que uno de los compuestos identificados en el extracto, el estigmasterol, disminuye la absorción del colesterol de la dieta al competir por su absorción.

Abstract

Patients with diabetes mellitus are at increased risk of suffering atherosclerotic cardiovascular diseases. Result of hyperglycemia and insulin deficiency have disturbances in lipid metabolism, as reflected high levels of triacylglycerides (TAG) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and low levels of high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) in serum. Previously, we reported that the ethanol extract of *Eryngium carlinae* was able to normalize the levels of total cholesterol and TAG in diabetic rats. In this study we made a fractionation and an analysis of the extract composition with the purpose of identifying potential compounds responsible for hypolipidemic effect. Determinations were performed on blood lipid profile and analyzing the activity of HMG-CoA reductase and the LDL receptor levels (LDL-r), comparing our results with a hypolipidemic drug, atorvastatin. The results indicated that the extract of *E. carlinae* decrease TAG, total cholesterol, non-HDL cholesterol and increase HDL cholesterol levels in the serum to levels equal or even higher than those induced by atorvastatin. The activity of HMG-CoA reductase and LDL-r levels in diabetic rats were not modified by the extract consumption, indicating that the hypolipidemic effect observed is not through the inhibition of the cholesterol biosynthesis as does atorvastatin, but possibly intestinal absorption level, since it has been reported that one of the identified compounds in the extract, stigmasterol, decreases competitively the absorption of dietary cholesterol.

1. Introducción

La Diabetes mellitus (DM) engloba un conjunto de desórdenes metabólicos caracterizados por hiperglucemia crónica como resultado de una ausente o inadecuada secreción y/o acción de la insulina, siendo ésta deficiencia la base para el desarrollo de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas que se presentan en el diabético [1].

Los pacientes con DM tienen una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas, por lo que las anomalías en el metabolismo de lípidos son frecuentes. Los efectos de la carencia de insulina en el metabolismo de lípidos se ven reflejados como un aumento en los niveles de ácidos grasos libres y triacilglicéridos y bajos niveles de colesterol-HDL (colesterol de las lipoproteínas de alta densidad) [2]. Más del 50% de las muertes relacionadas con la diabetes están asociadas con complicaciones macrovasculares, especialmente aterosclerosis. Múltiples factores de riesgo están asociados con la aterosclerosis, incluyendo hiperglucemia, hiperlipidemia y alteración del sistema angiotensina angiotensina [3]. Por lo tanto, el tratamiento para el paciente diabético debe ser integral para reducir los factores de riesgo que asocian la DM y las enfermedades cardiovasculares [4], lo que se lograría con el control de la hiperglucemia y de la dislipidemia.

No obstante de los avances en el desarrollo de medicamentos para controlar a los pacientes diabéticos, éstos frecuentemente optan por el consumo de plantas medicinales o sus extractos, ya sea que únicamente consuman a éstos últimos o en conjunto con la medicina alópata, lo cual puede representar un riesgo sobre todo cuando se desconocen los compuestos presentes en la planta y las posibles interacciones con los medicamentos [5]. Por lo anterior, es necesario el estudio etnofarmacológico de las plantas usadas de manera empírica, debido a que es indispensable tener conocimiento de los efectos farmacológicos y composición química de la especie que se consume [6].

Existen reportes acerca de plantas empleadas en la medicina tradicional a las cuales se les ha probado su actividad hipoglucemiante o hipolipemiante, incluyendo su consumo paralelo con medicina alópata [5]. *Eryngium carlinae* F. Delaroché (Apiaceae=Umbelliferae) comúnmente llamada “hierba del sapo”, es una planta empleada de manera tradicional por los

pacientes diabéticos, quienes la toman en cocimientos como “agua de uso”. En un estudio previo se reportó [7] que esta planta no presentó efecto hipoglucémico al ser administrado de manera oral (30 mg/kg de peso) durante 40 días a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) (45 mg/kg de peso), pero sí presentó un efecto hipolipidémico al disminuir los niveles de colesterol y triacilglicéridos en las ratas diabéticas, razón por la cual se considera que puede ser usado como coadyuvante en el tratamiento de las dislipidemias en los pacientes diabéticos.

En el presente trabajo se realizó un fraccionamiento y un análisis de la composición química del extracto etanólico de *E. carlinae* con la finalidad de identificar los compuestos responsables del efecto hipolipidémico observado, se realizó una determinación del perfil de lípidos (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol no-HDL, triacilglicéridos, índice aterogénico (IA), apolipoproteína B (Apo B) en suero y se analizó la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima clave en la biosíntesis del colesterol y los niveles de proteína del receptor LDL (LDL-r), el cual es el encargado de mediar la endocitosis de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con lo anterior se obtuvo información acerca del mecanismo de acción del extracto y se comparó su efecto con el de la atorvastatina, un hipolipemiente oral ampliamente usado.

2. Materiales y Métodos

2.1 Extracto de *E. carlinae*

Las plantas de *E. carlinae* fueron colectadas en la región de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México y un ejemplar de la planta fue depositado en el herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (No. 15214). El extracto fue preparado como se reportó previamente [7].

2.2 Fraccionamiento del extracto

Para la separación de las fracciones del extracto etanólico de *E. carlinae*, 500 µl (1g/ml) del extracto se sometieron a cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon placas de vidrio de 20 X 20 cm y 2.5 mm de espesor, con el gel de sílice como absorbente para

la fase estacionaria (Silica gel 60, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) y para la fase móvil una mezcla de cloroformo:metanol en una proporción de 2:1 % (v/v). Las placas se corrieron y se visualizaron con luz ultravioleta (UV) de onda corta ($\lambda=254$) mediante una lámpara (Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA) para determinar las bandas representativas de grupos de compuestos. Se separaron 6 fracciones en base a la separación de grupos de compuestos visualizados con UV (Anexo 1), las cuales fueron raspadas de las placas, colocadas en un matraz y extraídas del gel de sílice con 5 ml de etanol absoluto, mantenidas en agitación vigorosa por al menos 8 h y filtradas (Watman No.1). Posteriormente, las fracciones fueron llevadas a sequedad en rotavapor (temperatura menor de 50°C). Finalmente, cada fracción fue resuspendida en 500 μ l de etanol absoluto con el fin de estandarizar a la misma concentración en que se encuentra en el extracto completo. El extracto y las seis fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

2.3 Identificación de compuestos del extracto y fracciones por CG-EM

Para el análisis cromatográfico, se inyectó 1 μ l de cada extracto o fracción (1g/ml) en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un detector de masas selectivo Agilent 5973N, usando una columna capilar Equity 5 Supelco (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) (5% de fenil metil siloxano). La inyección fue con un flujo dividido (50:1) a 250 °C y se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de 1.0 ml/min. El programa de la temperatura del horno fue el siguiente: una temperatura inicial de 50 °C, seguido por una rampa de 13 °C por min para llegar a una temperatura de 200 °C, y una segunda rampa de 5 °C min⁻¹ para llegar a 300 °C. El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 1ml/min, con un voltaje de ionización a 70eV, a una temperatura de la interface de 250 °C, en modo SCAN y en un rango de masas de 50-500m/z. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los espectros obtenidos con los de la biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST98) y por comparación de sus Índices Kovats con los reportados en la literatura [8]. Los índices de retención o índices Kovats fueron calculados usando una serie continua de n-alcanos (C8-C20). La cuantificación de los picos se realizó de manera automática con el software Environmental ChemStation de Agilent Technologies, usando el método de área.

2.4 Animales de experimentación

Se emplearon ratas Wistar machos con un peso entre 290-400 g, las cuales permanecieron enjauladas y mantenidas a temperatura ambiente con ciclos luz/oscuridad de 12 h y alimentadas con dieta estándar para roedores y agua *ad libitum*. Se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales expedido por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

2.5 Inducción de la diabetes mellitus

La diabetes experimental fue inducida mediante la inyección intraperitoneal de STZ (45 mg/kg de peso) disuelta en buffer de citrato (pH 4.5), dosis única, en ratas con un ayuno previo de 12 h. A las ratas control se les administró únicamente el buffer de citrato. Cinco días después de la administración de estreptozotocina, se midieron los niveles de glucosa, las ratas con glucemia >300 mg/dL fueron empleadas para conformar los grupos diabéticos.

2.6 Diseño experimental

Las ratas fueron divididas al azar en diez grupos. El número de ratas para cada experimento se describe en el pie figura de los resultados. Grupo I: Control (durante el período experimental sólo recibieron el vehículo, etanol 50%). Grupo II: Control + *EC30* (durante el período experimental recibieron 30 mg/kg de peso del extracto etanólico de *E. carlinae*). Grupo III: Control + *F6EC30* (durante el período experimental recibieron la fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en la dosis de 30 mg/kg de peso). Grupo IV: Control + *F6EC3* (durante el período experimental recibieron la fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en la dosis de 3 mg/kg de peso). Grupo V: Control + Ator (durante el período experimental recibieron atorvastatina en una dosis de 10 mg/kg de peso). Grupo VI: Diabético (vehículo, etanol 50%). Grupo VII: Diabético + *EC30* (30 mg/kg de peso del extracto etanólico de *E. carlinae*). Grupo VIII: Diabético + *F6EC30* (fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en la dosis de 30 mg/kg de peso). Grupo IX: Diabético + *F6EC3* (fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en la dosis de 3 mg/kg de peso), Grupo X: Diabético + Ator

(atorvastatina 10 mg/kg de peso). Las ratas de los grupos V y X fueron administradas con atorvastatina (Lipitor, Pfizer) suspendida en agua destilada, 10 mg/kg de peso/día, empleando una sonda orogástrica para su administración, esta misma vía fue empleada para la administración del el extracto y las fracciones. El tratamiento fue administrado una vez cada día durante 40 días.

2.7 Registro del peso corporal, glucemia, consumo de agua y alimento

Durante el período experimental diariamente se registró el consumo de agua y alimento. Cada cinco días las ratas fueron pesadas y sus niveles de glucosa fueron medidos empleando un glucómetro comercial (Accu-Check Sensor III Glucometer) a través de una punción en la punta de la cola.

2.8 Recolección de las muestras

Concluidos los 40 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previo ayuno desde la noche anterior. La sangre fue colectada y el suero separado para las determinaciones bioquímicas. Rápidamente fueron extraídos hígado y riñones, pesados y colocados en medio 1 (Manitol 220 mM, Sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) a 4 °C, para la obtención de homogenados, mitocondrias (hígado y riñón) y microsomas (hígado). Se tomaron muestras del hígado, riñones, páncreas y cerebro se colocaron en formaldehído al 4% para estudios histopatológicos posteriores.

2.9 Determinación de glucosa, perfil de lípidos y Apo B en suero

Glucosa, colesterol total, triacilglicéridos, colesterol-HDL y Apo B fueron determinados usando un kit comercial (BioSystems, España). La glucosa fue determinada midiendo la oxidación enzimática catalizada a través de la reacción de Trinder [9]. El colesterol total fue determinado midiendo la oxidación e hidrólisis enzimática con la reacción de Trinder [10]. Los triacilglicéridos fueron determinados por un método colorimétrico usando glicerol-3-fosfato-oxidasa [11]. El colesterol-HDL, fue determinado espectrofotométricamente en el sobrenadante de la mezcla de reacción, después de que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) fueran precipitadas en

presencia de fosfolipos y iones magnesio [12]. La Apo B fue determinada por inmunturbidimetría empleando anticuerpos anti-apolipoproteína B [13]. El índice aterogénico (colesterol total/c-HDL) [14] y el colesterol no-HDL (colesterol total - c-HDL) fueron calculados [15].

2.10 Preparación de microsomas de hígado

El hígado fue homogenizado a 4 °C en medio 1 empleando un homogenizador de vidrio con vástago de teflón impulsado con un motor. Los microsomas fueron preparados siguiendo el método descrito por Honda *et al.* [16] con algunas modificaciones como se describe a continuación. El homogenado fue centrifugado a 2,000 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) por 10 min y el sobrenadante fue centrifugado a 7,500 rpm por 10 min. El sobrenadante de la centrifugación de 7,500 rpm fue centrifugado a 32,600 rpm (ultracentrífuga Beckman L-80) por 90 min a 4 °C y el precipitado (fracción microsomal) fue resuspendido en medio 2 (Sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, KH₂PO₄ 40 mM y EDTA 30 mM; pH 7.2) y repartido en alícuotas a las cuales se les adicionó DTT a una concentración final de 10 mM y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteína en las muestras de microsomas fue determinada por el método de Lowry [17].

2.11 Medición de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa

El ensayo fue realizado empleando un método espectrofotométrico descrito por Edwards *et al.* [18] con algunas modificaciones para su optimización. Los microsomas fueron descongelados a 37°C antes de adicionar un volumen igual de glicerol 50% en medio 3 (medio 2 más DTT 10 mM) precalentado a 37 °C. La suspensión fue homogeneizada y luego incubada a 37°C durante 60 min. La suspensión fue diluida tres veces con medio 3 precalentado a 37°C para dar una concentración final del glicerol de 8.3%, nuevamente homogeneizada y centrifugada a 32,600 rpm (ultracentrífuga Beckman L-80) por 60 min a 25°C. El sobrenadante que contenía la enzima HMG-CoA reductasa solubilizada, fue separado y empleado de inmediato para el análisis de la actividad. La actividad de la HMG-CoA reductasa fue determinada a 37°C en un volumen total de 1 mL empleando un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 18). La longitud de la celda fue de 1 cm. La

velocidad de oxidación del NADPH fue inicialmente determinada en ausencia de HMG-CoA y este valor fue restado del obtenido con ambos sustratos. El medio 4 (KCl 20 mM, KH₂PO₄ 160 mM y EDTA 4 mM y DTT 10 mM; pH 6.8) junto con NADPH 0.2 mM y RS-HMG-CoA 0.1 mM, fueron usados para medir la actividad. Una unidad de actividad de la enzima es definida como la cantidad requerida para oxidar 2 nmoles de NADPH por minuto, y es equivalente a la síntesis de 1 nmol de mevalonato por minuto.

2.12 Inmunodetección del LDL-r

Para la inmunodetección del LDL-r, la pastilla microsomal fue resuspendida en medio de lisis-SDS (Tris-HCl 10 mM, pH 6.8, SDS 1% (w/v), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM). Una alícuota fue utilizada para medir la concentración de proteína. Un volumen correspondiente a 45 µg de proteína fue mezclado con un igual volumen de medio 5 (Tris-HCl, pH=6.8, SDS 15%, urea 8 M, glicerol 10% (v/v), DTT 100 mM). A la mezcla anterior fueron adicionados 6 µl de buffer de carga (SDS 12%, azul de bromofenol 0.02%, glicerol 30%, Tris-HCl 0.15 mM, pH 6.8, β-mercaptoetanol 6%). La mezcla se incubó por 20 min a 37°C y sometida a SDS-PAGE 10%. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno) empleando un equipo de transferencia húmeda (Bio-Rad) durante 60 min a 100 V. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con TBS-leche no grasa 5%, durante 1 h a temperatura ambiente en agitación continua. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de cabra anti-LDLr (goat-polyclonal-IgG, Santa Cruz Biotechnology) en TBS-leche 5% (1:1,000) toda la noche en agitación continua a 4°C. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a peroxidasa (donkey anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology) en TBS-leche 5% (1:2,000) durante 2 h. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS durante 10 min. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia (Wester Blotting Luminol Reagent; Santa Cruz Biotechnology), las membranas se expusieron por tiempos variados de 30 s a 10 min. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner Epson Stylus TX130 (Epson) y la intensidad de las bandas fueron determinadas empleando un software de análisis de imágenes (ImageJ).

2.13 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm Error Estándar (EE). La significancia estadística ($p < 0.5$) fue determinada con una prueba *t* de Student empleando el software GraphPad Prism 5.

3. Resultados y Discusión

3.1 Composición química del extracto etanólico de *E. carlinae*

Para conocer la composición química del extracto etanólico de *E. carlinae*, éste fue separado por cromatografía en capa fina y los compuestos identificados por CG-EM. Se identificaron 9 compuestos mayoritarios, los cuales se enlistan en la Cuadro 1. Un cromatograma representativo del extracto etanólico de *E. carlinae* se muestra en el Anexo 2.

Cuadro 1. Separación e identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto etanólico de *E. carlinae* por CG-EM.

| No. | <i>I</i> ^a | Compuestos | % de Abundancia |
|-----|-----------------------|--------------------|-----------------|
| 1 | 1322.14 | elemeno | 1.61 |
| 2 | 1387.28 | humuleno | 2.81 |
| 3 | 1419.60 | β -selineno | 26.04 |
| 4 | 1426.97 | α -selineno | 17.54 |
| 5 | 1432.42 | α -cedreno | 1.10 |
| 6 | 1473.13 | elemol | 1.78 |
| 7 | 1857.16 | ácido palmítico | 14.43 |
| 8 | 2056.88 | ácido esteárico | 14.54 |
| 9 | 3113.35 | estigmasterol | 2.12 |

a: Índice de Retención Kovats.

Las seis fracciones obtenidas del extracto de *E. carlinae* fueron analizadas por CG-EM, sin embargo, la abundancia de los compuestos fue muy baja en las primeras cinco fracciones y sólo la fracción seis (*F6*) presentó algunos de los compuestos identificados en el extracto

completo (β -selineno, α -selineno y estigmasterol), probablemente por la técnica empleada no fueron detectados más compuestos, por esta razón, sólo la fracción (F6) fue administrada a las ratas diabéticas en dos dosis 30 mg/dl y 3 mg/dl (grupos identificados como F6EC30 y F6EC3, respectivamente), se probó una dosis de 3 mg/dl, ya que como se trataba de una fracción los compuestos podrían estar muy concentrados y provocar un efecto tóxico en las ratas.

De los compuestos identificados en el extracto etanólico de *E. carlinae*, se ha reportado que el elemeno tiene un efecto antiproliferativo sobre las células de carcinoma renal [19] lo que ha conllevado a que se busque la mejor presentación farmacológica de administrarlo [20]. En estudios realizados en ratas con una dieta alta en colesterol, a las cuales se les administró el aceite esencial de *Dendropanax morbifera* Leveille, mostraron una mejora en el perfil de lípidos, el análisis cromatográfico identificó al elemeno como principal constituyente del aceite esencial [21].

El humuleno es un sesquiterpeno con actividad antiinflamatoria [22], que ha sido probado en un modelo experimental de inflamación alérgica de las vías respiratorias [23], pero el efecto sobre el perfil de lípidos no ha sido reportado. El selineno y el α -cedreno, por separado, se reportan como componentes mayoritarios de extractos con actividad antimicrobiana [24-26]. El elemol ha sido probado como repelente de las garrapatas *Ixodes scapularis* y *Amblyomma americanum* [27].

El ácido palmítico y el ácido esteárico son dos ácidos grasos saturados ampliamente distribuidos en la dieta. Su presencia se relaciona con niveles elevados de colesterol en suero [28]. El ácido esteárico a diferencia de otros ácidos grasos saturados como el ácido palmítico, no eleva los niveles de colesterol en suero ni los de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (colesterol-LDL). Estudios en animales de laboratorio y en seres humanos han evidenciado que el ácido esteárico es transformado rápidamente en ácido oleico [29]. Otros estudios reportan que el estigmasterol reduce los niveles de colesterol en plasma a través de la inhibición de su síntesis hepática y su absorción intestinal [30], por lo que, junto con el elemeno, son los compuestos que probablemente estén relacionado con el efecto hipolipidémico encontrado en el extracto de *E. carlinae*.

3.2 Efecto de EC30, F6EC30 y F6EC3 sobre la ganancia de peso, consumo de agua y alimento e índice de eficiencia alimenticia

Los cambios en el peso de los animales fueron registrados y se muestran en la Cuadro 2. Los grupos controles presentaron una ganancia de peso que fue mayor para el grupo que consumió F6EC30 (33%) y la menor ganancia fue observada para el grupo que consumió atorvastatina (23%). Una tendencia similar se presentó en los grupos diabéticos, sólo que en la mayoría no hay ganancia sino pérdida de peso. El grupo diabético + F6EC30 tuvo una ganancia del 1% y el grupo diabético que consumió atorvastatina tuvo la mayor pérdida de peso (6%). Con estos resultados, se asume que la pérdida de peso observada en los grupos diabéticos indica un buen establecimiento del modelo de diabetes. La mayor pérdida de peso (o menor ganancia) observada en los grupos que consumieron atorvastatina coincide con otros reportes donde la ésta al ser administrada durante ocho semanas a conejos normales provoca una reducción de peso [31], sin embargo, el efecto de la atorvastatina puede ser complejo, ya que se ha reportado que previene la pérdida de peso provocada por la diabetes [32].

El consumo de agua fue similar entre grupos controles. En el grupo diabético, el consumo de agua fue mayor comparado con los controles ($p < 0.05$). En los grupos diabéticos que recibieron cualquiera EC30, F6EC30, F6EC3 o atorvastatina, el consumo fue aumentado significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el grupo diabético sin tratamiento. La misma tendencia fue observada en el consumo de alimento, el grupo diabético consumió más alimento que el control normal ($p < 0.05$), datos que también corroboran el establecimiento de la condición diabética. De igual manera, los grupos que recibieron cualquiera EC30, F6EC30, F6EC3 o atorvastatina aumentaron el consumo de alimento comparado con el grupo diabético sin tratamiento ($p < 0.05$). Sin embargo, aunque las ratas diabéticas consumieran mayor cantidad de alimento, el índice de eficiencia alimenticia es bajo, siendo negativo en las ratas diabéticas (Cuadro 2), lo que indica que no hay aprovechamiento de la gran cantidad de alimento que consumen debido a la condición diabética, además, esta diferencia en el consumo de alimento en las ratas diabéticas puede ser la responsable del aumento visto en los lípidos del suero.

Cuadro 2. Efecto de EC30, F6EC30 y F6EC3 sobre el consumo de agua, alimento, IEA y porcentaje de ganancia de peso al término de la administración oral durante 40 días.

| Grupo | Peso inicial (g) | Peso final (g) | Ganancia de peso (%) | Consumo de agua (ml/rata/día) | Consumo de alimento (g/rata/día) | Índice Eficiencia Alimenticia |
|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Control | 343±16 | 451±17 | 31 | 25.2±0.3 | 41±1 | 0.095 |
| Control + EC30 | 338±14 | 437±26 | 29 | 25.0±0.3 | 33±6 | 0.088 |
| Control + F6EC30 | 328±08 | 441±06 | 33 | 25.1±0.4 | 44±1 | 0.098 |
| Control + F6EC3 | 336±14 | 428±13 | 27 | 26.0±0.3 | 50±1 ⁺ | 0.079 |
| Control + Ator | 332±19 | 415±25 | 23 | 26.4±0.6 | 51±2 ⁺ | 0.070 |
| Diabético | 304±12 | 297±09 | -2 | 46.3±0.8 | 180±4 | -0.004 |
| Diabético + EC30 | 292±11 | 276±11 | -4 | 48.6±0.6* | 194±4* | -0.006 |
| Diabético + F6EC30 | 300±08 | 303±11 | 1 | 50.0±0.8* | 201±4* | 0.002 |
| Diabético + F6EC3 | 381±20 | 389±26 | -4 | 56.0±1.3* | 236±6* | -0.007 |
| Diabético + Ator | 335±15 | 314±24 | -6 | 55.2±0.8* | 239±4* | -0.009 |

Los datos representan la media ± EE. Grupos controles n=4-12, grupos diabéticos n=4-15

EC30: representa el extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 30 mg/kg de peso.

F630: representa la fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 30 mg/kg de peso.

F63: representa la fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 3 mg/kg de peso.

Ator: representa Atorvastatina administrada en una dosis de 10 mg/kg de peso.

Índice de Eficiencia Alimenticia: representa consumo de alimento (g)/ganancia de peso (g)

+ $p < 0.05$ vs. grupo control

* $p < 0.05$ vs. grupo diabético

3.3 Efecto de *EC30*, *F6EC30* y *F6EC3* sobre la glucosa, el perfil de lípidos y la Apo B

La inducción de la diabetes experimental fue confirmada por los niveles elevados de glucosa que presentaron los grupos diabéticos y como se reportó previamente [7]. El tratamiento durante 40 días con el extracto de *E. carlinae* no modifica los niveles de glucemia. En este estudio, la administración de *F6EC30* y *F6EC3* tampoco tuvieron eficacia para reducir los niveles de glucosa en sangre (Cuadro 3), y en el caso del grupo diabético que recibió atorvastatina los niveles de glucemia aumentaron ($p<0.05$). Al respecto, existen pocas evidencias de que la atorvastatina realmente deteriore el metabolismo de la glucosa en los pacientes diabéticos, los estudios en este sentido son limitados [33].

El efecto de la administración de *EC30*, *F6EC30*, *F6EC3* y atorvastatina sobre el perfil de lípidos y Apo B se muestran en la Cuadro 3. En este estudio el aumento en los niveles de glucosa en el grupo diabético va acompañado de un aumento en los niveles de triacilglicéridos y una disminución en el colesterol-HDL ($p<0.05$), lo que se ve reflejado con un índice aterogénico elevado de 6 (colesterol total/colesterol-HDL) y por lo tanto, un mayor riesgo de padecer algún evento cardiovascular [33a].

Como previamente se reportó, el tratamiento con el extracto de *E. carlinae* disminuye los niveles de colesterol total y triacilglicéridos [7]. En este estudio, se demostró que también es capaz de disminuir el colesterol-LDL y aumentar el colesterol-HDL ($p<0.05$) lo que se ve reflejado como una disminución en el índice aterogénico (3) a niveles deseables y por tanto también disminuyen las probabilidades de padecer algún evento cardiovascular. Estos efectos fueron comparables con los producidos por el fármaco atorvastatina que también presentó en el grupo administrado un índice aterogénico deseable (3).

En los grupos controles sin o con tratamiento (*F6EC30* y *F6EC3*) presentaron un índice aterogénico bajo (2-3) ya que sus niveles de colesterol total y colesterol no-HDL son bajos, por lo tanto, no están en riesgo de presentar un evento cardiovascular. El incremento en los niveles de TAG en los grupos controles *F6EC30* y *F6EC3* puede ser debido al aumento en la cantidad de alimento ingerido en comparación con los otros grupos controles.

Cuadro 3. Efecto de EC30, F6EC30 y F6EC3 sobre la glucosa y el perfil de lípidos al término de la administración durante 40 días.

| Grupo | Concentración (mg/dl) | | | | | | IA |
|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------|----|
| | Glucosa | Colesterol Total | Triacilglicéridos | Colesterol-HDL | Colesterol-no HDL | Apo B | |
| Control | 76±6 | 68±3 | 63±3 | 22±1 | 47±6 | 12±1 | 3 |
| Control + EC30 | 78±4 | 66±6 | 46±6 ⁺ | 20±1 | 45±7 | 14±4 | 3 |
| Control + F6EC30 | 73±11 | 44±4 ⁺ | 76±16 | 21±1 | 24±4 ⁺ | ND | 2 |
| Control + F6EC3 | 51±9 | 27±4 ⁺ | 109±6 ⁺ | 15±2 ⁺ | 11±3 ⁺ | ND | 2 |
| Control + Ator | 74±18 | 30±18 ⁺ | 112±11 ⁺ | 15±2 ⁺ | 16±9 ⁺ | 12±3 | 2 |
| Diabético | 397±30 | 74±7 | 224±40 | 13±2 | 61±7 | 10±10 | 6 |
| Diabético + EC30 | 373±27 | 55±4* | 123±23* | 20±2* | 35±4* | 12±2 | 3 |
| Diabético + F6EC30 | 452±29 | 66±9 | 127±19 | 18±2 | 49±7 | ND | 4 |
| Diabético + F6EC3 | 397±80 | 57±13 | 156±15 | 20±2* | 37±9 | ND | 3 |
| Diabético + Ator | 564±69* | 47±14 | 141±5 | 15±2 | 32±8* | 11±5 | 3 |

Los datos representan la media ± EE. Grupos control n=3-12, grupos diabéticos n=3-15, Apo B grupo diabético n=2.

EC30: representa el extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 30 mg/kg de peso.

F630: representa la fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 30 mg/kg de peso.

F63: representa la fracción 6 del extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 3 mg/kg de peso.

Ator: representa Atorvastatina administrada en una dosis de 10 mg/kg de peso.

IA (*Índice Aterogénico*): colesterol total/HDL-colesterol.

+*p*<0.05 comparado con el grupo control, **p*<0.05 comparado con el grupo diabético.

ND: no determinado

La elevación de los triacilglicéridos observado en el grupo diabético sin tratamiento (Cuadro 3), puede ser debido a que por la condición diabética que genera una incapacidad de aprovechar los carbohidratos provoca un aumento en la lipólisis en tejido adiposo y por lo tanto, mayor cantidad de triacilglicéridos circulantes. La reducción observada de triacilglicéridos puede verse favorecida si la cantidad de Apo B, esencial para la formación de VLDL, se ve disminuida, pero queda por definir ya que en este estudio el número de muestras no fue suficiente.

El colesterol no-HDL (calculado de la resta del colesterol-HDL al colesterol total), representa el colesterol contenido en las VLDL, IDL y LDL y su estimación es usada cuando no se determina Apo B [34]. En nuestro estudio el grupo diabético mostró un mayor nivel de colesterol no-HDL y el tratamiento con EC30 lo disminuyó ($p < 0.05$). Esta misma tendencia se observó en el grupo diabético que consumió atorvastatina ($p < 0.05$), lo que nos puede indicar que el efecto del consumo de EC30 puede implicar una menor secreción de VLDL por parte del hígado o en una mayor captación de LDL por parte del mismo. Los grupos diabéticos que consumieron *F6EC30* y *F6EC3* no mostraron disminución significativa en los niveles de colesterol no-HDL. La falta de efecto observada en los grupos que consumieron las fracciones puede ser debido a que compuestos necesarios para que el extracto lleve a cabo su efecto no están presentes en ellas.

Aunque generalmente se considera que los niveles de colesterol-LDL deben ser el blanco terapéutico para controlar la dislipidemia y reducir el riesgo cardiovascular, estudios epidemiológicos han demostrado que el colesterol no-HDL y la Apo B, pueden ser mejores predictores de eventos cardiovasculares [35, 36], ya que la determinación de Apo B podría evidenciar individuos con elevado riesgo de dislipidemia como consecuencia de los elevados niveles de Apo B [35].

La Apo B es la principal molécula proteica de las LDL, IDL y VLDL, por lo que la determinación de su concentración nos da una estimación de la cantidad de estas partículas en el suero y no únicamente de las LDL. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos y tratamientos (Cuadro 3), lo que podría indicar que el consumo de *EC30* más que disminuir el número de lipoproteínas que son secretadas por el hígado puede estar afectando la cantidad de colesterol presente en cada

una de ellas. Cabe mencionar que para el grupo diabético sin tratamiento, el error estándar obtenido no permite asegurar completamente que la condición diabética no elevó los niveles de Apo B como se ha reportado en algunas investigaciones [35a], por lo que se considera necesario llevar a cabo más determinaciones.

3.4 Efecto de EC30 sobre la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa

La enzima microsomal HMG-CoA reductasa cataliza la síntesis de mevalonato, precursor metabólico del colesterol, este es el paso limitante en la biosíntesis de colesterol [35b], de ahí que sea utilizado como blanco terapéutico. Las estatinas son inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Actualmente, son ampliamente usadas para bajar los niveles de colesterol a través de la disminución de su síntesis y al incremento del número de receptores de LDL tanto a nivel hepático como extrahepático, lo que da lugar a un incremento de la absorción y del catabolismo de LDL. En este estudio, la atorvastatina fue administrada a un grupo control y un grupo diabético, para comparar su efecto sobre la HMG-CoA reductasa con la del extracto de *E. carlinae*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

Como se puede observar, tanto en grupos controles como en diabéticos que recibieron el extracto de *E. carlinae* durante 40 días, no se presentaron modificaciones significativas en la actividad de la enzima HMG-CoA, lo que sugiere que el efecto hipolipemiante del extracto de *E. carlinae* no es a través de la reducción de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa y por consecuencia de la síntesis de colesterol, es necesario considerar otros posibles blancos de acción, como la inhibición de la absorción intestinal de colesterol, por ejemplo. Aunque no es significativo, parece haber un aumento en la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en el grupo de ratas diabéticas que consume el extracto, esto puede ser debido a un mecanismo compensatorio a la reducción en la absorción del colesterol proveniente de la dieta debido a compuestos presentes en el extracto como el estigmasterol, lo cual ha sido reportado [30].

Por otra parte, cabe resaltar que tanto el grupo control como el diabético que recibió atorvastatina durante 40 días tuvieron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima (Fig. 1), lo que corresponde al mecanismo de acción de las estatinas

a través del cual disminuyen los niveles de colesterol, lo cual es observado en este trabajo. Se ha reportado que la atorvastatina tiene un efecto prolongado inhibiendo la biosíntesis de colesterol comparado con otras estatinas.

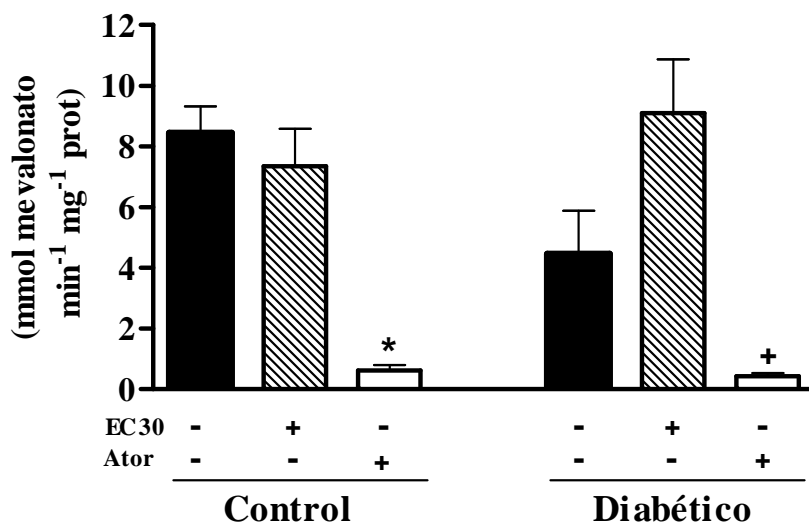


Fig. 1. Efecto de EC30 sobre la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en microsomas de hígado de rata. Los diferentes grupos de ratas fueron tratados con el extracto etanólico de *E. carlinae* o con atorvastatina durante 40 días, al final del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y el hígado empleado para la obtención de microsomas que fueron utilizados para la determinación de la actividad enzimática. Los datos son la media \pm EE. n=3-7. EC30: extracto etanólico de *E. carlinae* (30mg/kg de peso). Ator: atorvastatina (10 mg/kg de peso). * $p < 0.05$ vs. control sin tratamiento. + $p < 0.05$ vs. diabético sin tratamiento.

3.5 Efecto de EC30 sobre el nivel de proteína del receptor LDL

En la Figura 2 se observa que los niveles del receptor LDL hepático no varían significativamente en las ratas tanto controles como diabéticas que recibieron la administración del extracto de *E. carlinae* durante 40 días, lo que sugiere que la forma de actuar del extracto no es a través de la modificación en el número de receptores que captan

a las LDL reduciendo el colesterol circulante. Por lo tanto, es necesario explorar más los puntos de regulación que pudieran estar siendo modificados al administrar el extracto.

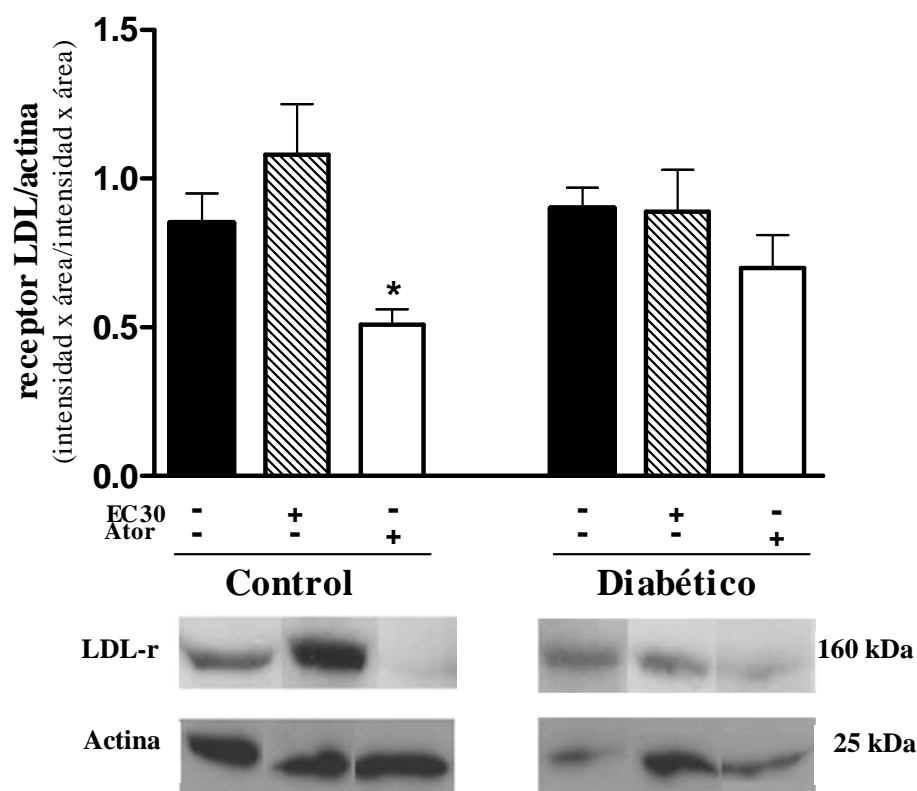


Fig. 2. Efecto de EC30 sobre los niveles del receptor LDL en microsomas de hígado de rata. Análisis densitométrico y Western blot representativo de los niveles del receptor LDL (LDL-r) hepático de los grupos control y diabéticos tratados con el extracto etanólico de *E. carlinae* (EC30) o con atorvastatina (Ator) durante 40 días. Al final del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y el hígado empleado para la obtención de microsomas que fueron utilizados para la determinación de los niveles del receptor LDL. Los datos son la media \pm EE de al menos tres experimentos independientes. EC30: extracto etanólico de *E. carlinae* (30mg/kg de peso). Ator: atorvastatina (10 mg/kg de peso). * $p < 0.05$ vs. control sin tratamiento. La cuantificación de proteína del receptor fue calculada por análisis densitométrico normalizando con la cantidad de actina que sirvió de estándar interno.

En cuanto a los grupos que tomaron atorvastatina, puede observarse una disminución significativa de la cantidad de los receptores en el grupo control ($p < 0.05$) y

aunque la tendencia es similar en el grupo diabético, la disminución no es significativa (Fig. 2). Cabe mencionar que por un tiempo fue considerado que la eficacia de las estatinas para bajar los niveles de colesterol era debida a su capacidad de retirar del suero las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través del aumento en la función del receptor LDL hepático [37], sin embargo, en otros reportes se ha observado que la atorvastatina aumenta los niveles del ARNm del receptor LDL, por lo que incrementa el recambio de receptores, no de la cantidad de proteína, lo que a su vez aumentó la captación de lipoproteínas LDL [38]. Con estos resultados se considera que la disminución observada en la cantidad de receptores LDL en el grupo control que recibió atorvastatina es consecuencia de la poca cantidad de colesterol no-HDL circulante.

Resumiendo, el análisis fitoquímico del extracto de *E. carlinae* revela como componentes mayoritarios a seis sesquiterpenos, dos ácidos grasos saturados y un estero. En conjunto, los sesquiterpenos encontrados han sido relacionados con actividades antiproliferativas, antiinflamatorias y antimicrobianas [19-26]. De los dos ácidos grasos encontrados, no hay evidencia de que puedan mejorar el perfil lipídico, por el contrario, el ácido palmítico es considerado de los más aterogénicos. Por su parte, el ácido esteárico se considera “neutral” en cuanto a su capacidad de modificar la concentración de colesterol, específicamente el de las LDL. De los compuestos presentes en el extracto, el estigmasterol es el único del que se ha reportado un mecanismo que disminuye lípidos [30].

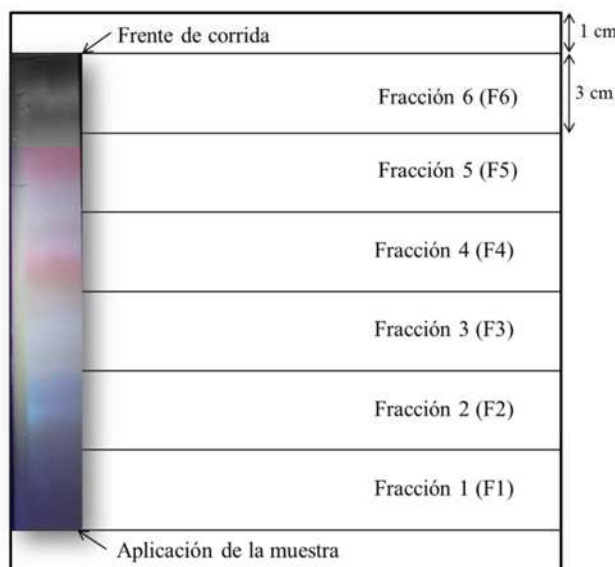
Tomando en cuenta lo anterior y considerando los resultados obtenidos en el tratamiento con el extracto etanólico de *E. carlinae*, el cual no modifica la síntesis de colesterol a través de la enzima HMG-CoA reductasa, ni tampoco modifica los niveles de proteína del receptor LDL, que sería otra vía a partir de la cual el colesterol sanguíneo podría disminuir, se considera que a nivel intestinal, el estigmasterol, un estero contenido en el extracto de *E. carlinae*, puede competir con la absorción del colesterol proveniente de la dieta incorporándose en las micelas y desplazando al colesterol y siendo pobremente absorbido [30], disminuyendo de esta manera los niveles de colesterol incorporados. Se ha reportado que el estigmasterol también suprime la síntesis hepática de colesterol y de ácidos biliares. En esta investigación, tal efecto no se presentó, posiblemente, porque en este estudio se administró en conjunto con demás compuestos del extracto de *E. carlinae*, y

en el reporte se administró estigmasterol purificado [30]. Las fracciones probadas *F6EC30* y *F6EC3* no mostraron el mismo efecto debido posiblemente a que tenían menor cantidad de estigmasterol que el extracto completo.

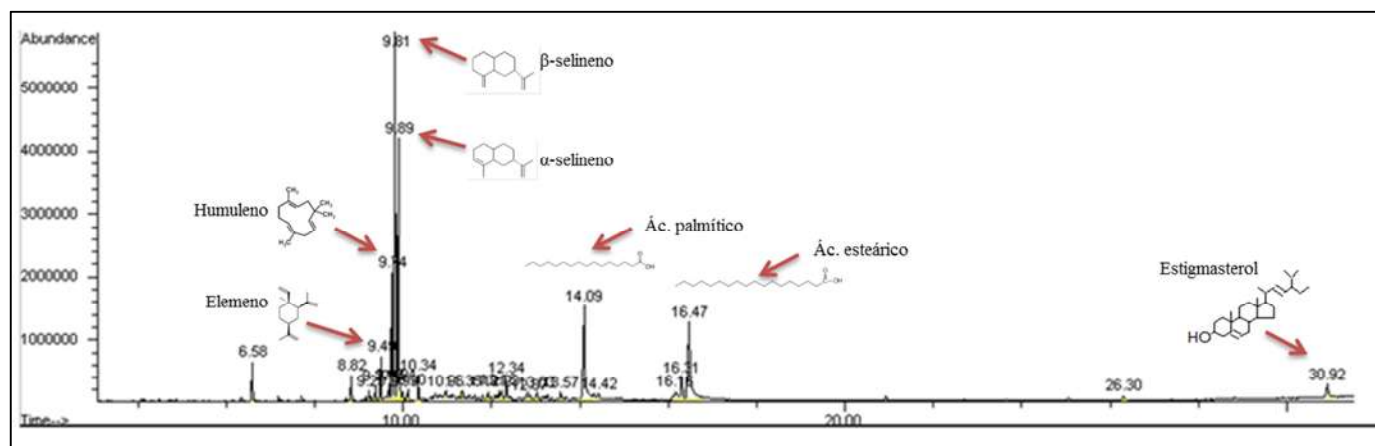
4. Conclusión

El extracto etanólico de *E. carlinae* cuando es administrado por 40 días a ratas diabéticas inducidas con STZ, es capaz de disminuir los niveles de triacilglicéridos, colesterol total, colesterol no-HDL y de aumentar los niveles séricos de colesterol-HDL en magnitud similar o aún mejor que la atorvastatina, lo que se refleja como una disminución en el índice aterogénico. El mecanismo de acción del extracto difiere con el de la atorvastatina ya que no actúa sobre la HMG-CoA reductasa. Los efectos benéficos del extracto etanólico de *E. carlinae* pueden ser atribuidos a su contenido de estigmasterol, al competir con el colesterol de la dieta por su absorción intestinal.

5. Anexos



Anexo 1. Esquema del método de separación del extracto de *E. carlinae*. El extracto fue separado por cromatografía en capa fina en placas de 20x20 cm. Las bandas fueron visualizadas empleado luz UV de onda corta ($\lambda=254$) y se obtuvieron seis fracciones.



Anexo 2. Cromatograma representativo del análisis del extracto etanólico de *E. carlinae*. El análisis cromatográfico fue realizado bajo las condiciones descritas en el apartado de Materiales y Métodos. Se indican los picos correspondientes a algunos de los compuestos mayoritarios identificados.

6. Bibliografía

- [1] World Health Organization. 1999. **“Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications”**. *Report of WHO Consulation*, Geneva, Switzerland.
- [2] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003. **Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus**. *Diabetes Care* 26, S5-S20.
- [3] Feng, B., Xu, L., Wang, H., Yan, X., Xue, J., Liu, F. y Hu, J. F. 2011. **Atorvastatin exerts its anti-atherosclerotic effects by targeting the receptor for advanced glycation end products**. *Biochim Biophys Acta* (9):1130-1137.
- [4] Grundy, S. M., Benjamin, I. J., Burke, G. L., Chait, A., Eckel, R. H., Howard, B. W., Mitch, W., Smith, S. C. Jr. y Sowers, J. R. 1999. **Diabetes and cardiovascular disease : a statement for healthcare professionals from the american heart association**. *Circulation* 100:1134-1146.
- [5] Brinker, F. 1998. **Herb contraindications and drug interactions**, 4th Ed., Eclectic Medical Publications: Sandy, OR, USA.
- [6] Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. 2011. **From the field into the lab: useful approaches to selecting species based on local knowledge**. *Front Pharmacol.* 2:20.
- [7] Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Ávila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I. y Saavedra-Molina, A. 2012. **Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats**. *Biochem Res Int* 2012:603501.
- [8] Adams, R. P. 2007. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. viii pp.
- [9] Barham, D. y Trinder, P. 1972. **An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system**. *The Analyst* 97(1151):142-145.
- [10] Deeg, R. y Ziegenhorn, J. 1983. **Kinetic enzymic method for automated determination of total cholesterol in serum**. *Clinical Chemistry* 29(10): 1798–1802.

- [11] Cole, T. G., Klotzsch, S. G. y McNamara, J. 1997. **Measurement of triglyceride concentration.** En: Handbook of Lipoprotein Testing. Rifai, N., Warnick, G. R. y Dominiczak, M. H. Eds. pp. 115–126, AACC Press, Washington, DC, USA.
- [12] Burstein, M., Scholnick, H. R. y Morfin, R. 1970. **Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions.** *J Lipid Res* 11(6):583-95.
- [13] Price, C.P., Spencer, K. y Whicher, J. 1983. **Light-scattering immunoassay of specific proteins: a review.** *Ann Clin Biochem* 20: 1-14.
- [14] Kumari, K., Mathew, B.C. y Augusti, K.T. 1995. **Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* Linn.** *Indian J Biochem Biophys.* 32(1):49-54.
- [15] Wägner, A. M., Pérez, A., Zapico, E. y Ordóñez-Llanos, J. 2003. **Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B in the dyslipidemic classification of type 2 diabetic patients.** *Diabetes Care* 26(7): 2048-2051.
- [16] Honda, A., G. Salen, Y. Matsuzaki, A. K. Batta, G. Xu, E. Leitersdorf, G. S. Tint, S. K. Erickson, N. Tanaka, and S. Shefer. 2001. **Differences in hepatic levels of intermediates in bile acid biosynthesis between Cyp272/2 mice and CTX.** *J. Lipid Res* 42:291–300.
- [17] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- [18] Edwards, P. A., Lemongello, D. y Fogelman, A. M. 1979. **Improved methods for the solubilization and assay of hepatic 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *J. Lipid Res* 20:40–46.
- [19] Zhan, Y. H., Liu, J., Qu, X. J., Hou, K. Z., Wang, K. F., Liu, Y.P. y Wu, B. 2012. **β -Elemene induces apoptosis in human renal-cell carcinoma 786-0 cells through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/ mTOR signalling pathways.** *Asian Pac J Cancer Prev* 13(6):2739-44.
- [20] Chen, M., Zhang, J., Yu, S., Wang, S., Zhang, Z., Chen, J., Xiao, J. y Wang, Y. 2012. **Anti-lung-cancer activity and liposome-based delivery systems of β -elemene.** *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 (2012).

- [21] Chung, I. M., Kim, M. Y., Park, W. H. y Moon, H. I. 2009. **Antiatherogenic activity of *Dendropanax morbifera* essential oil in rats.** *Pharmazie* 64(8):547-9.
- [22] Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., Pianowski, L. F. y Calixto, J.B. 2007. **Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*.** *Eur J Pharmacol* 569(3):228-36.
- [23] Rogerio, A.P., Andrade, E. L., Leite, D.F., Figueiredo, C.P. y Calixto, J.B. 2009. **Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene alpha-humulene in experimental airways allergic inflammation.** *Br J Pharmacol* 158(4):1074-87.
- [24] Kumar Tyagi A, Bukvicki, D., Gottardi, D., Veljic, M., Guerzoni, M.E., Malik, A. y Marin, P. D. 2013. **Antimicrobial potential and chemical characterization of serbian liverwort (*Porella arboris-vitae*): SEM and TEM observations.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:382927.
- [25] Hsouna, A. B. y Hamdi, N. 2012. **Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia.** *Lipids Health Dis* 5(11):167.
- [26] Cárdenas, J., Rojas, J., Rojas-Fermin, L., Lucena, M. y Buitrago, A. **Essential oil composition and antibacterial activity of *Monticalia greenmaniana* (Asteraceae).** *Nat Prod Commun* 7(2):243-244.
- [27] Carroll, J.F., Paluch, G., Coats, J. y Kramer, M. 2009. **Elemol and amyris oil repel the ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in laboratory bioassays.** *Exp Appl Acarol* 51(4):383-92.
- [28] Hegsted, D. M., McGandy, R. B., Myers, M.L. y Stare, F. J. 1965. **Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man.** *Am J Clin Nutr* 17(5):281-95.
- [29] Bonanome, A. y Grundy, S.M. 1998. **Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels.** *N Engl J Med* 318(19):1244-8.
- [30] Batta, A. K., Xu, G., Honda, A., Miyazaki, T. y Salen, G. 2006. **Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat.** *Metabolism* 55(3):292-299.

- [31] Siddiq, A., Khan, R. A. y Baig, S. G. 2011. **Does atorvastatin work more effectively than biguanides in reducing cardiovascular risk factors?** *J Pharm Bioallied Sci* 3(2):306–309.
- [32] Pareek, A., Yeole, P. G., Tenpe, C. R., Chandurkar, N. y Payghan, R. 2009. **Effect of atorvastatin and hydroxychloroquine combination on blood glucose in alloxan-induced diabetic rats.** *Indian J Pharmacol* 41(3):125-8.
- [33] Sasaki, J., Iwashita, M. y Kono, S. 2006. **Statins: beneficial or adverse for glucose metabolism.** *J Atheroscler Thromb* 13(3):123-9.
- [33a] Rui-Li, Y., Yong-Hui, S., Gang, H., Wu, L. y Guo-Wei, L. 2008. **Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index** *J Clin Biochem Nutr* 43(3):154–158.
- [34] Grundy, S. M. 2002. **Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy.** *Circulation* 106:2526–2529.
- [35] Walldius, G., Jungner, I., Holme, I., Aastveit, A. H., Kolar, W. y Steiner, E. 2001. **High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study.** *Lancet* 358:2026–2033.
- [35a] Gupta, S., Sharma, S. B., Singh, U. R. y Bansal, S. K. 2011. **Salutary effect of *Cassia auriculata* L. Leaves on hyperglycemia-induced atherosclerotic environment in streptozotocin rats.** *Cardiovasc Toxicol* 11(4):308-15.
- [35b] Angelin, B., K. Einarsson, L. Liljeqvist, K. Niesell, and R. A. Heller. 1984. **3-Hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductasa in human liver microsomes: active and inactive forms and cross-reactivity with antibody against rat liver enzyme.** *J. Lipid Res* 25:1159-1166.
- [36] Cui, Y., Blumenthal, R. S., Flaws, J. A., Whiteman, M. K., Langenberg, P., Bachorik, P. S. y Bush, T. L. 2001. **Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality.** *Arch Intern Med* 161:1413–1419.
- [37] Ness, G. C., Zhao, Z. y Lopez, D. 1996. **Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low-density lipoprotein receptor protein degradation.** *Arch Biochem Biophys* 325(2):242-8.

- [38] Ness, G. C., Chambers, C. M. y Lopez, D. 1998. **Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity.** *Journal of Lipid Research* Volume 39, 1998.

Capítulo 3

Evaluación de la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de *Eryngium carlinae*

Resumen

Eryngium carlinae es una planta empleada en la medicina tradicional por los diabéticos para controlar los niveles de glucosa y lípidos. Algunos estudios han corroborado que el extracto etanólico de *E. carlinae* tiene propiedades hipolipidémicas, sin embargo, no existen reportes acerca del estudio de su potencial antioxidante. El objetivo de este estudio fue evaluar la posible actividad antioxidante *in vitro* de varias preparaciones acuosas, etanólicas y fracciones de *E. carlinae* y compararlas con su efecto *in vivo*. Los resultados indican que de los extractos probados, el etanólico muestra la mayor capacidad antioxidante que cualquiera de sus fracciones o las preparaciones acuosas al eliminar los radicales DPPH \cdot (1,1-difenil-2-picrilhidracil) y ABTS $^{+}$ (ácido 2,2'azinobis-[3 etilbenzotiazolina]-6-sulfónico), probablemente debido al contenido de flavonoides y fenoles encontrados en las determinaciones de la composición del extracto. La administración oral del extracto etanólico de *E. carlinae* a las ratas diabéticas no afecta la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa ni los niveles de lipoperoxidación en las mitocondrias de riñón. Además, se observó que el extracto es capaz de disminuir los niveles de óxido nítrico elevados en las ratas diabéticas en las primeras etapas de daño renal. El análisis de los cortes histológicos de riñón, apunta a una recuperación parcial de la arquitectura celular en riñones de las ratas diabéticas que consumieron el extracto etanólico de *E. carlinae*. Los resultados de esta investigación sugieren que el extracto etanólico de *E. carlinae* no tiene el mismo efecto *in vitro* que *in vivo*, posiblemente por transformaciones en los compuestos del extracto al ser consumidos de manera oral y tiene un efecto protector al disminuir las alteraciones estructurales que se desarrollan en el riñón en las primeras etapas de nefropatía diabética.

Abstract

Eryngium carlinae is a plant used in traditional medicine by diabetics to control blood glucose and lipids, studies have confirmed that the ethanol extract of *E. carlinae* hypolipidemic properties, however, there are no reports on the study of their potential antioxidant effect. The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity *in vitro* of aqueous, ethanolic extracts or fractions of *E. carlinae* and comparing their effect *in vivo*. Our results indicate that the extracts analyzed, the ethanolic extract whole showed higher antioxidant capacity than any of its fractions or aqueous preparations by eliminating DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radicals, probably due to the content of flavonoids and phenols found in the determinations of extract composition. Oral administration of the ethanol extract of *E. carlinae* to diabetic rats did not affect the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase or the levels of lipid peroxidation in mitochondria of kidney. It was observed that the extract is capable of reducing the nitric oxide levels (NO) elevated in diabetic rats in the early stages of kidney damage. Renal histological observations point to a partial recovery of cellular architecture in kidneys of diabetic rats that consumed ethanol extract of *E. carlinae*. Our results suggest that the ethanol extract of *E. carlinae* does not have the same effect *in vitro* that *in vivo*, possibly by changes in the compounds of the extract when consumed orally and has a protective effect by reducing structural alterations developed in the kidney in the early stages of diabetic nephropathy.

1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico que presenta alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas [1]. Todos los tipos de DM se caracterizan por hiperglucemia, la cual es el resultado de una relativa o absoluta deficiencia en la producción o acción de la insulina, o de una resistencia tejido-selectiva a la misma, lo que trae como resultado el desarrollo de las complicaciones microvasculares características de la diabetes como nefropatía, retinopatía y neuropatía periférica [2]. La diabetes también se asocia al desarrollo de complicaciones macrovasculares, como la aceleración del desarrollo de aterosclerosis que afecta importantes arterias que irrigan el corazón, cerebro y extremidades inferiores [2]. Esto ha conducido al desarrollo tanto de regímenes de tratamiento intensivo para el diabético, como de medidas preventivas [3].

Se han descrito cinco mecanismos por los cuales la hiperglucemia causa el daño y complicaciones en los tejidos: 1) aumento en el flujo de la vía de los polioles, 2) aumento en la formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGES), 3) incremento en la expresión del receptor para los AGES y sus ligandos activadores, 4) activación de las isoformas de la proteína cinasa (PK) C y 5) un aumento en la actividad de la vía de la hexosamina, sin embargo, las evidencias disponibles apuntan a que todos estos mecanismos se desencadenan por un evento en común, la sobreproducción de especies reactivas de oxígenos (ERO) por la mitocondria a consecuencia de la hiperglucemia [2,4]. Como se ha mencionado, la nefropatía diabética, es una de las complicaciones microvasculares más frecuentes en los diabéticos, probablemente causada por el estrés oxidativo mitocondrial que se produce como resultado de la hiperglucemia crónica. Por lo anterior, es importante encontrar alternativas de tratamiento que no sólo se enfoquen en controlar los niveles de glucemia, sino también a disminuir el estrés oxidativo que se haya generado como consecuencia del desequilibrio en los niveles de glucosa.

El uso de plantas con fines medicinales ha crecido en los últimos años, por lo cual es necesario el estudio científico de las propiedades y efectos ocasionados por estas especies para que su consumo sea seguro. *Eryngium carlinae* es una planta herbácea perene, endémica de México y Centroamérica. En comunidades de Michoacán, México, esta planta es usada de manera tradicional en preparaciones como “agua de uso” y

consumida por diabéticos, además, también es usada por las personas de las comunidades para tratar la tos, padecimientos estomacales y de la próstata [5].

Actualmente, no se sabe si el extracto etanólico de *E. carlinae* tiene algún beneficio adicional a las personas diabéticas que pueda relacionarse con la disminución del estrés oxidativo o el aumento de las defensas antioxidantes y no sólo ayudar a la disminución de los lípidos como ha sido reportado [6]. Tampoco hay reportes donde el contenido de fenoles, flavonoides y su actividad antioxidante *in vitro* hayan sido evaluados.

Por tanto, se consideró necesario la exploración del efecto antioxidante del extracto de *E. carlinae in vitro* y compararlo con su actividad antioxidante *in vivo* en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas, tomando en cuenta que es la mitocondria uno de los principales sitios de producción de especies reactivas y siendo los riñones los encargados de desechar los productos del metabolismo que pudieran estar afectando a este órgano, el cual también es de los primeros en presentar falla en una persona diabética.

En el presente estudio, se investigó por primera vez el efecto de *E. carlinae* sobre marcadores del estado antioxidante en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), así como los niveles de lipoperoxidación, niveles de óxido nítrico (NO), la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) y marcadores de daño renal. También, se midió la cantidad de fenoles y flavonoides totales, la actividad antioxidante *in vitro* por los métodos de DPPH[•] y ABTS^{•+} de diferentes extractos etanólicos y acuosos de *E. carlinae* y sus fracciones.

2. Materiales y Métodos

En este trabajo se estudiaron las posibles propiedades antioxidantes de los extractos de *E. carlinae* empleando un análisis *in vitro* y mediante ensayos *in vivo*. En este último se determinó el consumo del extracto de *E. carlinae* empleando un modelo de ratas diabéticas y realizando determinaciones en mitocondrias de riñón.

2.1 Material vegetal y preparación de los extractos de *E. carlinae*

Las plantas de *E. carlinae* fueron colectadas en la región de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México y un ejemplar de la planta fue depositado en el

herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (No. 15214). El extracto etanólico fue preparado como se reportó previamente [6] y para su posterior fraccionamiento, se empleó la técnica descrita en el capítulo 2.

Ejemplares de la planta de *E. carlinae* provenientes de la localidad de Cointzio (Municipio de Morelia, Michoacán, México) y de la localidad de Las Ranas (Municipio de Puruándiro, Michoacán, México) fueron recolectadas en el mes de octubre de 2010. Las partes aéreas de las plantas se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron; con ellas, se elaboraron extractos etanólicos siguiendo el protocolo previamente reportado [6]. Además se elaboraron extractos acuosos como se describe a continuación: 1,000 ml de agua hirviendo fueron agregados a 100 g de planta pulverizada, se agitaron y se dejaron reposar en hielo para atemperar. Se dejaron sedimentar por algunas horas y finalmente el extracto fue filtrado y almacenado en la oscuridad a 5°C hasta su uso. Las abreviaturas para referirnos a los distintos extractos son las siguientes: *EC*, *Eryngium carlinae*; *SJ*, Localidad Nuevo San Juan Parangaricutiro; *LR*, localidad Las Ranas; *CO*, localidad Cointzio; *F1-F6*: Fracción 1-6 del extracto etanólico de *E. carlinae*.

2.2 Experimentos *in vitro*

2.2.1 Determinación de fenoles totales

La determinación de la cantidad de fenoles totales en las muestras fue medida espectrofotométricamente basándose en el método descrito por Singleton y Rossi [7], con algunas modificaciones. A cada una de las muestras del extracto se les agregaron 800 µl de agua destilada y 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitaron y se dejaron reposar durante 8 min. Posteriormente, se les adicionaron 50 µl de Na₂CO₃ al 20% y después de 1 h se tomaron lecturas empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 a 760 nm. Se usaron soluciones de ácido gálico (0.5 mg/ml) para construir una curva estándar. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg AGA/g extracto).

2.2.2 Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides en las muestras fue determinado empleando el método descrito por Liu *et al.* [8] con modificaciones para optimización. A las muestras previamente preparadas se les adicionaron 1,250 µl de agua destilada y 75 µl de NaNO₂ al 5% y se dejaron reposar por 6 min. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de AlCl₃ al 10% y se dejaron reposar por 5 min más. Transcurrido el tiempo se adicionaron 500 µl de NaOH 1M y se completaron con agua destilada a un volumen final de 2,500 µl. La absorbencia de las muestras fue medida a 510 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18 antes de que transcurrieran 30 min. Diferentes volúmenes de una solución de catequina (0.1 mg/ml) fueron medidas bajo las mismas condiciones. Los resultados son expresados como mg de catequina por g de extracto (mg catequina/g extracto).

2.2.3 Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de *E. carlinae* por el método de DPPH

La actividad antioxidante de los extractos fue evaluada en base a la capacidad de eliminar el radical libre 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) en base al método descrito por Brand-Williams *et al.* [9] con modificaciones para adaptarlo a nuestras condiciones. Las soluciones de los extractos fueron mezcladas con 1,000 µl de la solución metanólica de DPPH 1 mM. Las muestras fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente y la absorbencia fue medida a 517 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18. Las diferencias en absorbencia entre la muestra y el control (DPPH en etanol) fueron calculadas y expresadas como % de atrapamiento del radical DPPH. Se emplearon soluciones de ácido gálico y catequina como estándares de referencia.

2.2.4 Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de *E. carlinae* por el método ABTS

La capacidad de atrapamiento de los radicales libres fue evaluada por el método del radical ABTS[•] (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) desarrollado por Re *et al.* [10], indicado para emplearse con compuestos coloridos como los extractos de éste estudio, adaptado a la metodología descrita por Kuskoski *et al.* [11], con modificaciones.

Para la preparación del radical ABTS^{•+}, se hizo reaccionar persulfato de potasio (2.45 mM) con ABTS (7mM). La mezcla se cubrió completamente y se dejó en agitación por al menos 16 h a temperatura ambiente para permitir la formación del radical. Transcurrido este tiempo, 150 µl del radical ABTS^{•+} fueron diluidos con 15 ml de etanol absoluto en un vaso cubierto con papel aluminio, para obtener una absorbencia de 0.7±0.02, se registró la absorbencia inicial y en la misma celda se añadieron 10 µl del extracto a probar diluido en etanol absoluto. La mezcla se agitó cuidadosamente y se comenzó a leer la absorbencia a 754 nm empleando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 18, se tomaron lecturas a 1 min y 6 min después de iniciar la reacción. Se realizó una curva estándar con Trolox disuelto en etanol (10 mM) con el mismo procedimiento para muestras y estándares. Los resultados fueron expresados como CAET (capacidad antioxidante equivalente a Trolox).

2.3 Experimentos *in vivo*

2.3.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratas Wistar machos con un peso entre 290-400 g, las cuales fueron mantenidas a temperatura ambiente con ciclos luz/oscuridad de 12 h y alimentadas con dieta estándar para roedores y agua *ad libitum*. Se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales expedido por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

2.3.2 Inducción de la diabetes mellitus

La diabetes fue inducida mediante la inyección intraperitoneal de STZ (45 mg/kg de peso) disuelta en buffer de citrato (pH 4.5), dosis única, en ratas con un ayuno previo de 12 h. A las ratas control se les administró únicamente el buffer de citrato. Cinco días después de la administración de STZ, se midieron los niveles de glucosa, las ratas con glucemia >300 mg/dl fueron empleadas para conformar los grupos diabéticos.

2.3.3 Diseño experimental

Las ratas fueron divididas al azar en cuatro grupos. El número de ratas de cada grupo se indica en el pie de figura de cada resultado. Grupo I: control (vehículo, etanol al 50%). Grupo II: control + *E. carlinae* (30 mg/kg de peso). Grupo III: diabético (vehículo, etanol al 50%). Grupo IV: diabético + *E. carlinae* (30 mg/kg de peso). El extracto administrado a los grupos control II y diabético IV, corresponde al extracto etanólico de *E. carlinae* preparado a partir de la planta colectada en la localidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México, extracto empleado en los procedimientos experimentales de los dos primeros capítulos. El extracto de *E. carlinae* fue administrado diariamente durante 40 días empleando una sonda orogástrica.

2.3.4 Recolección de muestras

Concluidos los 40 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previo ayuno desde la noche anterior. Rápidamente, se extrajeron el hígado y los riñones, se pesaron y los riñones se colocaron en medio 1 (Manitol 220 mM, Sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) a 4 °C, para la obtención de mitocondrias. El hígado fue empleado en determinaciones posteriores.

2.3.5 Aislamiento de mitocondrias de riñón

Las mitocondrias de riñón fueron aisladas empleando la técnica descrita por Saavedra-Molina y Devlin [12] con modificaciones para adecuar a nuestras condiciones. Una vez obtenidos los riñones y colocados en medio 1 a 4°C, fueron homogeneizados empleando un homogenizador de vidrio con vástago de teflón impulsado con un motor. El homogenado fue centrifugado a 2,000 rpm (centrífuga Beckman J2-MC) por 10 min, el sobrenadante fue centrifugado a 7,500 rpm por 10 min. El precipitado (fracción mitocondrial) fue resuspendido en medio 2 (Sacarosa 100 mM, KCl 50 mM, KH₂PO₄ 40 mM y EDTA 30 mM; pH 7.2), se le agregó albúmina de suero de bovino al 0.02% y fue centrifugado a 9,000 rpm por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 1 ml de medio 2 y la cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry *et al.* [13].

2.3.6 Determinación de los niveles de lipoperoxidación

La medición de los niveles de lipoperoxidación fue basada en el método del ácido tiobarbitúrico descrito por Buege y Aust [14] con algunas modificaciones para su optimización. Este método mide la producción de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) entre las que se encuentra el malondialdehído (MDH), un producto de la lipoperoxidación por radicales libres. Las mitocondrias (0.15 mg) fueron colocadas en tubos y resuspendidas en medio de fosfatos 0.15 M. A cada tubo se le agregaron 2 ml de una solución ácida (ácido tricloacético 15%, TBA 0.375% y HCl 0.25 N) y fueron calentados a baño María hirviendo durante 15 min, transcurrido este tiempo, los tubos fueron enfriados en hielo y centrifugados a 7,500 rpm por 5 min. Se extrajo el sobrenadante y se determinó la absorbencia a 535 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Los resultados se expresaron como nanomolas de TBARS/mg de proteína empleando el coeficiente de extinción molar del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.7 Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT

La actividad de la SOD fue determinada empleando un kit de análisis comercial (Sigma-Aldrich, USA), el cual permite analizar la actividad de la SOD mediante un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio Dojindo's altamente soluble en agua, WST-1 (sal monosódica (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que produce un tinte formazano cuando es reducida por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. Las lecturas fueron tomadas a 440 nm empleado un lector de microplacas (Stat Fax 2100).

La actividad CAT en las mitocondrias de riñón fue analizada empleando un kit comercial (Sigma-Aldrich, USA) por un método colorimétrico, el cual se basa en la medición del peróxido de hidrógeno que queda después de la acción de la CAT. Primero, la CAT convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (vía catalítica), después la reacción enzimática es detenida con azida de sodio. Una alícuota de la mezcla de reacción se analiza para determinar la cantidad de peróxido de hidrógeno restante [15]. Este método usa un fenol sustituido (ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno-sulfónico) que se acopla oxidativamente a la 4-aminoantipirina en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa

de rábano (HRP) para dar un tinte rojo quinoneimina que absorbe a 520 nm. La lectura de las muestras se llevó a cabo empleando un lector de microplacas (Stat Fax 2100).

2.3.8 Determinación de los niveles de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico (NO) se determinó midiendo la acumulación de nitritos en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas y controles con o sin tratamiento del extracto. Los nitritos fueron medidos como describe Green *et al.* [16] con algunas modificaciones para su optimización. A 100 μ l de reactivo de Griess (solución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% y solución NED (N-(naftil)-etilendiamina dihidrocloruro)) se adicionaron al sobrenadante de 0.5 mg de proteína mitocondrial e incubaron en la oscuridad por 10 min a temperatura ambiente. La absorbencia de la muestra fue medida a 546 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. La concentración de nitritos en las muestras fue calculada a partir de una curva estándar elaborada con nitrito de sodio (1 mM).

2.4 Observación histológica

Una porción del riñón y del páncreas de los diferentes grupos de ratas fueron fijadas en formaldehído al 4% y teñidos con hematoxilina-eosina para observación histológica.

2.5 Análisis estadístico

Los datos representan el promedio \pm error estándar (EE) del número de mediciones indicada en cada estudio. Los datos se analizaron por *t* de Student para determinar significancia ($p < 0.05$) de la diferencia entre los valores promedio de los diferentes grupos usando el programa GraphPad Prism 5.

3. Resultados

3.1 Experimentos *in vitro*

3.1.1 Determinación de fenoles y flavonoides totales

Los fenoles y flavonoides, son metabolitos secundarios de las plantas ampliamente distribuidos, estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes por su estructura química. Varios estudios reportan que estos compuestos tienen propiedades hipoglucemiantes, hipolipemiantes y antioxidantes [17-20]. El contenido de fenoles y flavonoides en los diferentes extractos se presenta en la Cuadro 1. De manera general, la cantidad de compuestos identificados se encuentra en cantidades similares a las reportadas para otros extractos de plantas [19]. Como puede observarse, los extractos etanólicos tienen mayor cantidad de compuestos que los respectivos compuestos acuosos.

Cuadro 1. Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de *E. carlinae*

| Muestra | Fenoles totales (mg de ácido gálico/g de materia seca) | Flavonoides totales (mg de catequina/g de materia seca) |
|------------------------------------|--|---|
| Extracto etanólico <i>EC SJ</i> | 0.8594 ± 0.1312 | 2.1528 ± 0.0876 |
| Extracto etanólico <i>EC LR</i> | 3.1026 ± 0.4716 | 7.8183 ± 1.7046 |
| Extracto etanólico <i>EC CO</i> | 1.9581 ± 0.3880 | 2.8766 ± 1.3894 |
| Extracto acuoso <i>EC LR</i> | 0.6029 ± 0.0120 | 0.8940 ± 0.0344 |
| Extracto acuoso <i>EC CO</i> | 0.3473 ± 0.0236 | 0.5748 ± 0.1014 |
| Extracto etanólico de <i>EC F1</i> | 0.0073 ± 0.0068 | 0.1642 ± 0.0229 |
| Extracto etanólico de <i>EC F2</i> | 0.0324 ± 0.0066 | 0.2188 ± 0.0601 |
| Extracto etanólico de <i>EC F3</i> | 0.0641 ± 0.0129 | 0.1321 ± 0.0046 |
| Extracto etanólico de <i>EC F4</i> | 0.0272 ± 0.0068 | 0.0633 ± 0.0092 |
| Extracto etanólico de <i>EC F5</i> | 0.0247 ± 0.0076 | 0.1317 ± 0.0041 |
| Extracto etanólico de <i>EC F6</i> | 0.9790 ± 0.1924 | 5.2408 ± 0.0408 |

Los datos representan la media ± EE de determinaciones por duplicado. **EC:** *Eryngium carlinae*, **SJ:** Localidad Nuevo San Juan Parangaricutiro, **LR:** localidad Las Ranas, **CO:** localidad Cointzio. **F1-F6:** Fracción 1-6 del extracto etanólico de *E. carlinae*.

De los tres extractos etanólicos, el que mayor cantidad de fenoles y flavonoides contiene es el que fue recolectado en la localidad de Las Ranas, lo cual puede ser debido a las variaciones en la composición del suelo donde crecieron, ya que se ha reportado que los metabolitos acumulados en una planta pueden variar dependiendo del lugar donde fueron aislados [20a]. El extracto que contiene menos compuestos fenoles y flavonoides es el elaborado de la planta recolectada en la localidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro. Posiblemente, la variación en este extracto sea debido a que tenía mayor tiempo de haber sido elaborado al momento de las determinaciones, por lo cual, alguna cantidad de los compuestos presentes pudo haberse deteriorado (Cuadro 1).

En cuanto a las fracciones del extracto etanólico de *E. carlinae* en el cuadro 1 se muestra que la fracción 6 es la que tiene mayor número de fenoles y flavonoides. Esto concuerda con el análisis de CG-EM realizado a las muestras, donde se observa que sólo en la fracción 6 se detectan compuestos de importancia (Capítulo 2, datos no mostrados). Debe tomarse en cuenta que la detección de compuestos fitoquímicos bioactivos no garantiza que el extracto tenga alguna propiedad biológica, ya que esto depende de la concentración en que se encuentre de manera natural, de los demás tipos de compuestos con los que esté combinado y con los que pudiera ejercer algún efecto sinérgico para poder lograr su actividad [21].

3.1.2 Determinación de la actividad antioxidante por los métodos de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos por medio de dos métodos basados en la eliminación de diferentes radicales (DPPH[•] y ABTS^{•+}). Esto fue decidido ya que los compuestos presentes en el extracto pueden tener diferentes mecanismos para interactuar con los radicales [22] y de esta manera dar como resultado diferente capacidad antioxidante que se verá reflejada como un porcentaje de eliminación del radical distinto. Los resultados obtenidos se muestran en la Cuadro 2 como puede apreciarse.

Cuadro 2. Determinación de la actividad antioxidante por el método del radical DPPH y por el método del radical ABTS⁺ de los extractos de *E. carlinae*

| Muestra | DPPH | ABTS | |
|-----------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|
| | (% de eliminación radical DPPH) | (% de eliminación radical ABTS ⁺) | CAET μ M/g de materia seca |
| Extracto etanólico EC SJ | 72.5 \pm 19.7 | 91.5 \pm 0.9 | 6412.9 \pm 62.8 |
| Extracto etanólico EC LR | 89.0 \pm 1.5 | 98.2 \pm 0.3 | 6896.5 \pm 19.3 |
| Extracto etanólico EC CO | 94.7 \pm 0.5 | 92.4 \pm 0.2 | 6478.8 \pm 15.7 |
| Extracto acuoso EC LR | 96.7 \pm 0.7 | 99.4 \pm 0.3 | 6982.5 \pm 18.1 |
| Extracto acuoso EC CO | 81.2 \pm 2.3 | 72.9 \pm 2.7 | 5074.9 \pm 193.1 |
| Extracto etanólico de EC F1 | 5.6 \pm 3.5 | 10.5 \pm 0.1 | 578.0 \pm 6.2 |
| Extracto etanólico de EC F2 | 42.5 \pm 3.7 | 38.1 \pm 0.3 | 2568.2 \pm 20.0 |
| Extracto etanólico de EC F3 | 19.7 \pm 1.4 | 18.8 \pm 0.3 | 1174.2 \pm 22.7 |
| Extracto etanólico de EC F4 | UD | ND | ND |
| Extracto etanólico de EC F5 | UD | 8.9 \pm 1.2 | 465.1 \pm 83.7 |
| Extracto etanólico de EC F6 | UD | 23.2 \pm 0.2 | 1493.3 \pm 17.9 |

Los datos representan la media \pm EE de determinaciones por duplicado. **EC:** *Eryngium carlinae*, **SJ:** Localidad Nuevo San Juan Parangaricutiro, **LR:** localidad Las Ranas, **CO:** localidad Cointzio. **F1-F6:** Fracción 1-6 del extracto etanólico de *E. carlinae*. **CAET:** capacidad antioxidante equivalente a Trolox. **ND:** no determinada. **UD:** no detectado.

La capacidad para eliminar a cada uno de los radicales varía de un método a otro. En cuanto al porcentaje de eliminación de radical estable DPPH podemos notar que de los extractos, los preparados con plantas recolectadas en la localidad de Las Ranas, tanto el acuoso como el etanólico, muestran la mayor actividad antioxidante con el mayor porcentaje de eliminación (96.7 \pm 0.7% y 89.0 \pm 1.5%, respectivamente), seguido por los extractos etanólico y acuoso elaborados con las plantas recolectadas en la comunidad de Cointzio (89.0 \pm 1.5% y 81.2 \pm 2.3%, respectivamente) y el de menor actividad fue el extracto etanólico elaborado con plantas recolectadas en la localidad de Nuevo San Juan

Parangaricutiro ($72.5 \pm 19.7\%$), que como se mencionó anteriormente, puede ser debido a que los compuestos de este extracto se han ido perdiendo con el tiempo que ha transcurrido desde su preparación. Aunque los extractos muestran un porcentaje de inhibición elevada, cabe mencionar que para alcanzar esta actividad, es necesario una concentración de extracto 4,000 veces mayor que la que requiere el estándar de ácido gálico para ejercer aproximadamente el mismo porcentaje de eliminación del radical DPPH \cdot (10 mg extracto/0.0025 mg ácido gálico), posiblemente porque en los extractos probados no se encuentran puros e interacciones con otros compuestos presentes pueden disminuir su efecto antioxidante.

En cuanto a las fracciones del extracto etanólico de *E. carlinae* (Cuadro 2), podemos ver que tuvieron menor porcentaje de eliminación que los extractos completos y las fracciones 4-6 no tuvieron capacidad para eliminar el radical DPPH \cdot , lo que nos indica que para efectos de una mejor actividad antioxidante es mejor consumir los extractos completos.

Con respecto a los resultados de la capacidad de eliminar al catión radical ABTS $^{+\cdot}$, nuevamente, los extractos etanólico y acuoso preparados con plantas recolectadas en la localidad de Las Ranas, tuvieron el mayor porcentaje de eliminación del radical ABTS $^{+\cdot}$ ($98.2 \pm 0.3\%$ y $99.4 \pm 0.3\%$, respectivamente), seguido por los extractos etanólicos preparados con plantas de la localidad de Cointzio y Nuevo San Juan Parangaricutiro ($92.4 \pm 0.2\%$ y $91.5 \pm 0.9\%$, respectivamente) que tuvieron una actividad muy similar. Las fracciones del extracto etanólico de *E. carlinae*, al igual que con el método anterior, tuvieron menor capacidad para eliminar el radical ABTS $^{+\cdot}$ que los extractos completos. El Cuadro 2, también muestra los resultados como capacidad antioxidante equivalente a Trolox, un análogo hidrosoluble del α -tocoferol, en $\mu\text{M/g}$ de materia seca del extracto.

3.2 Experimentos *in vivo*

3.2.1 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre el peso del hígado y los riñones

Se ha comprobado que la diabetes causa hipertrofia renal como resultado de la hiperglucemia [23] y que ésta podría ser atenuada modulando los niveles de glucosa. En

nuestro estudio probamos si el consumo del extracto de *E. carlinae* sería capaz de disminuir la hipertrofia renal por un medio alternativo que no implicara la disminución de los niveles de glucosa, que como se ha reportado [6], el extracto de *E. carlinae* no es capaz de lograr. Los resultados obtenidos del peso del hígado y de los riñones se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto de *E. carlinae* sobre el peso de hígado y riñones de las ratas tratadas durante 40 días con el extracto.

| Grupo | % | |
|----------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | Peso riñón (g) / Peso corporal (g) | Peso hígado (g) / Peso corporal (g) |
| Control | 0.59 ± 0.01 | 2.5 ± 0.1 |
| Control + EC | 0.62 ± 0.01 | 2.6 ± 0.1 |
| Diabético | 1.0 ± 0.03* | 3.0 ± 0.6 |
| Diabético + EC | 1.1 ± 0.1 | 4.7 ± 0.3* |

Los datos representan la media ± EE. Grupos controles n=4, grupos diabéticos n=6. **EC:** grupos que recibieron el extracto etanólico de *E. carlinae* en una dosis de 30 mg/kg de peso. * $p < 0.05$ vs. control.

Los resultados muestran que los animales del grupo diabético presentan un peso mayor en los riñones comparado con el peso corporal y que el consumo del extracto no modifica esta tendencia, por lo que además de corroborar que el extracto etanólico de *E. carlinae* no modula la hiperglucemia generadora del estrés oxidativo que relaciona con el desarrollo de la hipertrofia renal, podemos sugerir que no causa un daño adicional al ser consumido durante los 40 días del tratamiento ya que no se observa un aumento en la hipertrofia renal.

Como se ha reportado en otros trabajos [24], los animales diabéticos muestran un hígado más grande, respecto a su peso corporal comparado con los controles, sin embargo, en nuestro estudio no llega a ser significativo debido a la variación en los datos (Cuadro 3). Podemos observar que en el grupo diabético que consumió el extracto de *E. carlinae* hay un aumento significativo del peso del hígado en relación con el peso corporal, esto puede deberse a que el metabolismo de las sustancias químicas presentes en el extracto etanólico de *E. carlinae* causan toxicidad al tejido hepático o, por otra parte, el aumento en el tamaño

del hígado puede sugerir que el extracto puede estar actuando a nivel hepático sobre el almacenamiento y movilización de lípidos, y de esta manera modificar los lípidos sanguíneos, como ya se ha reportado [6], ya que como es sabido el hígado juega un papel central en la regulación de los lípidos sanguíneos. Sin embargo, no podemos asegurar la causa del aumento, el análisis de cortes histológicos ayudaría a conocer los cambios que se pudieran estar presentando a causa del extracto.

3.2.2 Efecto del extracto etanólico *E. carlinae* sobre los niveles de NO

La concentración de nitritos en las mitocondrias de riñón de ratas controles y diabéticas, tratadas o no con extracto de *E. carlinae*, fue determinada como una medición indirecta de los niveles de óxido nítrico (NO). Como se puede observar en la Figura 1, hay un aumento significativo en los niveles de NO en el grupo diabético comparado con el control ($p < 0.05$), y el tratamiento con el extracto de *E. carlinae* en el grupo diabético provoca que los niveles se normalicen.

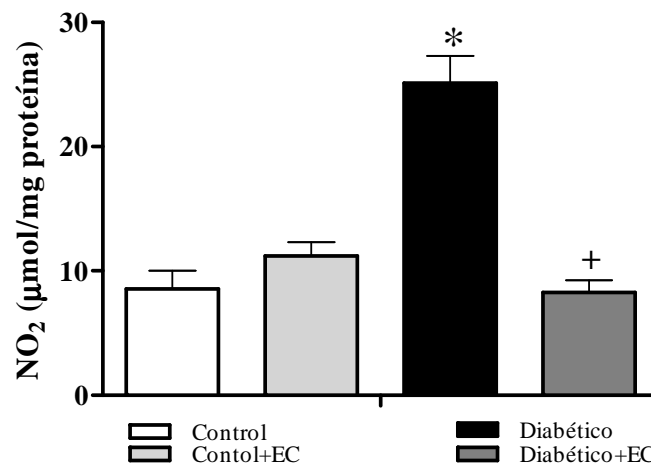


Figura 1. Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre los niveles de NO en mitocondrias de riñón. Los valores representan la media \pm EE. Grupos controles n=4, grupos diabéticos n=5. * $p < 0.05$ vs. control, ⁺ $p < 0.05$ vs. diabético. Se midieron los niveles de nitritos como una determinación indirecta de los niveles de NO. Las mitocondrias de riñón de ratas (0.5 mg) de los diferentes grupos fueron incubadas con 100 µl de reactivo de Griess por 10 min y la absorbencia leída a 546 nm empleando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lamda 18. La concentración de nitritos en las muestras fue calculada a partir de una curva estándar elaborada con nitrito de sodio (1 mM).

Estos resultados concuerdan con revisiones acerca del desarrollo de la nefropatía diabética [25] donde mencionan que en etapas tempranas de este padecimiento hay un aumento en los niveles del NO, que de continuar el daño renal se verán disminuidos agravando la nefropatía. La disminución de los niveles de NO provocada por el consumo del extracto de *E. carlinae* puede estar relacionada con un retardo en el desarrollo de la nefropatía diabética.

3.2.3 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre los niveles de TBARS

La concentración de TBARS en mitocondrias de riñón de los diferentes grupos de ratas se muestra en la Figura 2. Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos controles o diabéticos con o sin el tratamiento del extracto de *E. carlinae*. Nuestros resultados difieren de los reportados en otros estudios donde se observa un aumento en los niveles de TBARS de mitocondrias de riñón de ratas de 20 días de tratamiento con un compuesto aislado de *Corni fructus* [26].

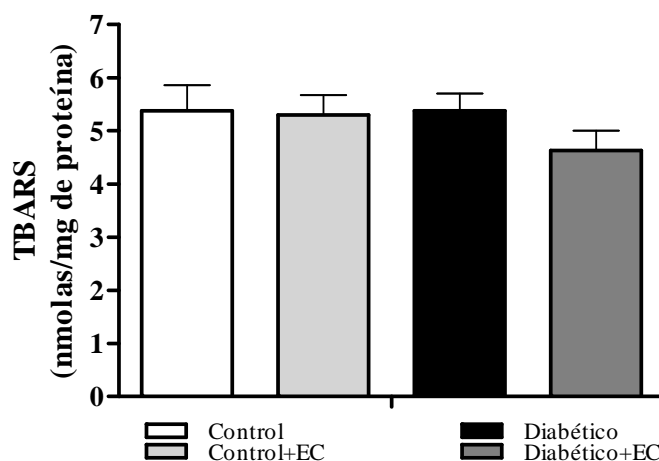


Figura 2. Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre los niveles de TBARS en las mitocondrias de riñón. Los valores representan la media \pm EE. Grupos controles n=4, grupos diabéticos n=5. Las mitocondrias de riñón de ratas (0.15 mg) de los diferentes grupos fueron resuspendidas en medio de fosfatos 0.15 M, mezcladas con una solución ácida y calentadas a baño María durante 15 min, posteriormente fueron centrifugadas y el sobrenadante empleado para la determinación de la absorbencia a 535 nm en un

espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18. Para los cálculos se empleó el coeficiente de extinción molar del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Consideramos que estas diferencias pueden ser el resultado de una respuesta adaptativa que se presenta tiempo después de la inducción de la diabetes en las ratas, donde la mitocondria aún es capaz de responder para mantener su integridad. Se observa una tendencia a disminuir los niveles de TBARS en el grupo diabético sin llegar a ser significativa, sin embargo, podría significar que el extracto puede ayudar a proteger aún más contra el desarrollo del daño oxidativo en las mitocondrias de riñón.

3.2.4 Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre la actividad de las enzimas SOD y CAT

La actividad de la SOD y CAT se muestran en las Figuras 3A y 3B. Se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la SOD y la CAT en el grupo diabético sin tratamiento comparado con el control sin tratamiento. El tratamiento con el extracto de *E. carlinae* no modifica este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes. Nuestros resultados sugieren que estos cambios son un mecanismo de respuesta aumentando las defensas antioxidantes ante la presencia de estrés oxidativo que se trata de contrarrestar con un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes, lo cual explicaría que no se observen diferencias en los niveles de TBARS debido posiblemente a que aún se controla el daño por estrés oxidativo.

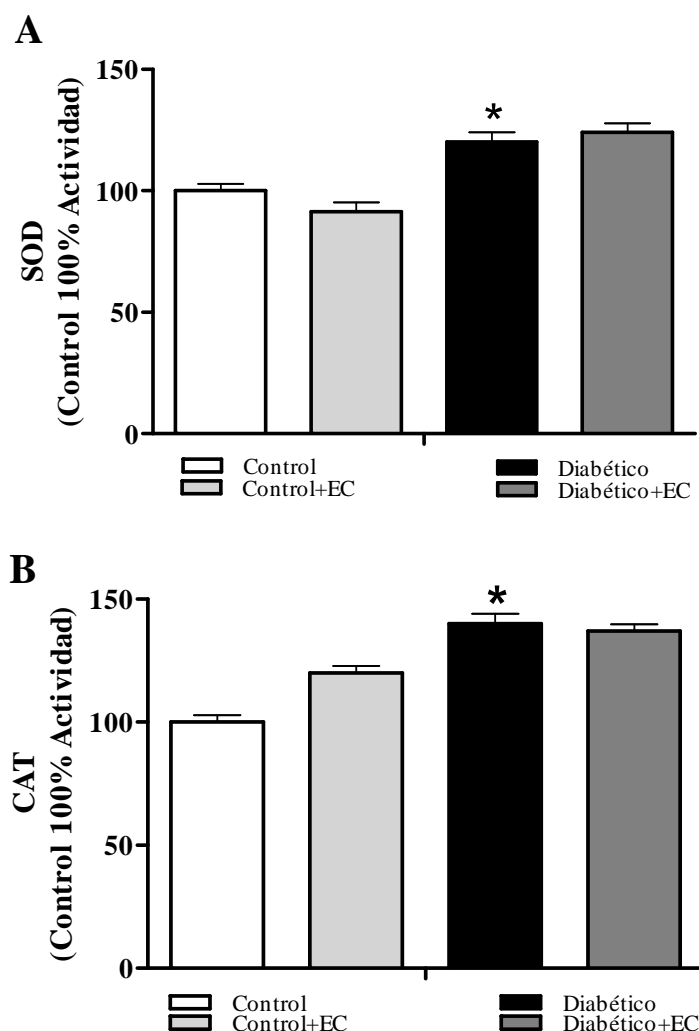


Figura 3. Efecto del extracto etanólico de *E. carlinae* sobre la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en mitocondrias de riñón. (A) actividad SOD y (B) actividad CAT. Los valores representan la media \pm EE. Grupos controles n=4, grupos diabéticos n=5. * p <0.05 vs. control. El análisis de la actividad de las enzimas fue realizado empleando kits comerciales (Sigma-Aldrich) por métodos colóriméticos, la determinación de la actividad de la SOD se basa en la inhibición de la reducción de una sal de tetrazolio por eliminación del anión superóxido realizando lecturas a 440 nm y la determinación de la actividad de la CAT se basa en la medición del peróxido de hidrógeno que queda después de la acción de ésta enzima, realizando lecturas a 520 nm, empleando para ambos casos un lector de microplacas (Stat Fax 2100).

3.2.4 Observación de los cambios histológicos en páncreas y riñones producidos por el extracto etanólico de *E. carlinae*

Como se ha venido mencionando durante el desarrollo de éste trabajo, el extracto etanólico de *E. carlinae* no tiene actividad hipoglucémica, para corroborar estos resultados se realizó una examinación histológica de tejido de páncreas para observar que no hubiera modificaciones en la arquitectura celular a consecuencia del consumo del extracto etanólico de *E. carlinae*.

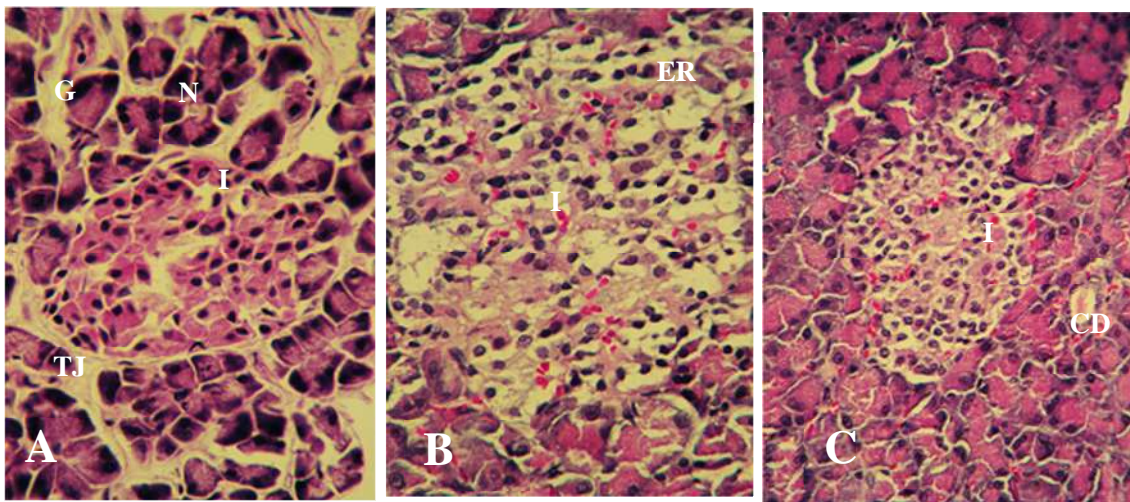


Figura 4. Fotografía de cortes histológicos de páncreas de ratas. En las fotografías se pueden apreciar los islotes de Langerhans de los diferente grupos: controles (A), diabéticos (B) y diabéticos que consumieron el extracto de *E. carlinae* (C). Cortes de páncreas fueron embebidos en parafina y se obtuvieron cortes de 10 μm de grosor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados a 40X. I: islote de Langerhans; N: acinos pancreáticos; G: granos de cimógeno; TJ: tejido conectivo intralobulillar; CD: conducto pancreático; ER: eritrocitos.

Se realizó una examinación histológica de los cortes de páncreas de ratas controles muestra las células de los islotes conservando su estructura normal. Se observa que la relación núcleo-citoplasma se conserva (Fig. 4A). En el caso de los cortes de páncreas de ratas diabéticas, se observa que los islotes pierden la relación núcleo-citoplasma en algunas células, hay disminución y edema del citoplasma de algunas células, lo que sugiere que su función está comprometida (Fig. 4B). En el caso de los cortes de páncreas pertenecientes a ratas diabéticas que consumieron el extracto etanólico de *E. carlinae*, se observa que no hay

recuperación de los cambios originados por la condición diabética (Fig. 4C), por lo que confirmamos que el extracto no produce cambios en el páncreas que permitan su recuperación y actividad normal.

Las observaciones histopatológicas de cortes de riñones de ratas normales pertenecientes a los grupos controles muestran una arquitectura normal donde se pueden apreciar un glomérulo rodeado por la cápsula de Bowman y los túbulos proximales sin cambios inflamatorios (Fig. 5A).

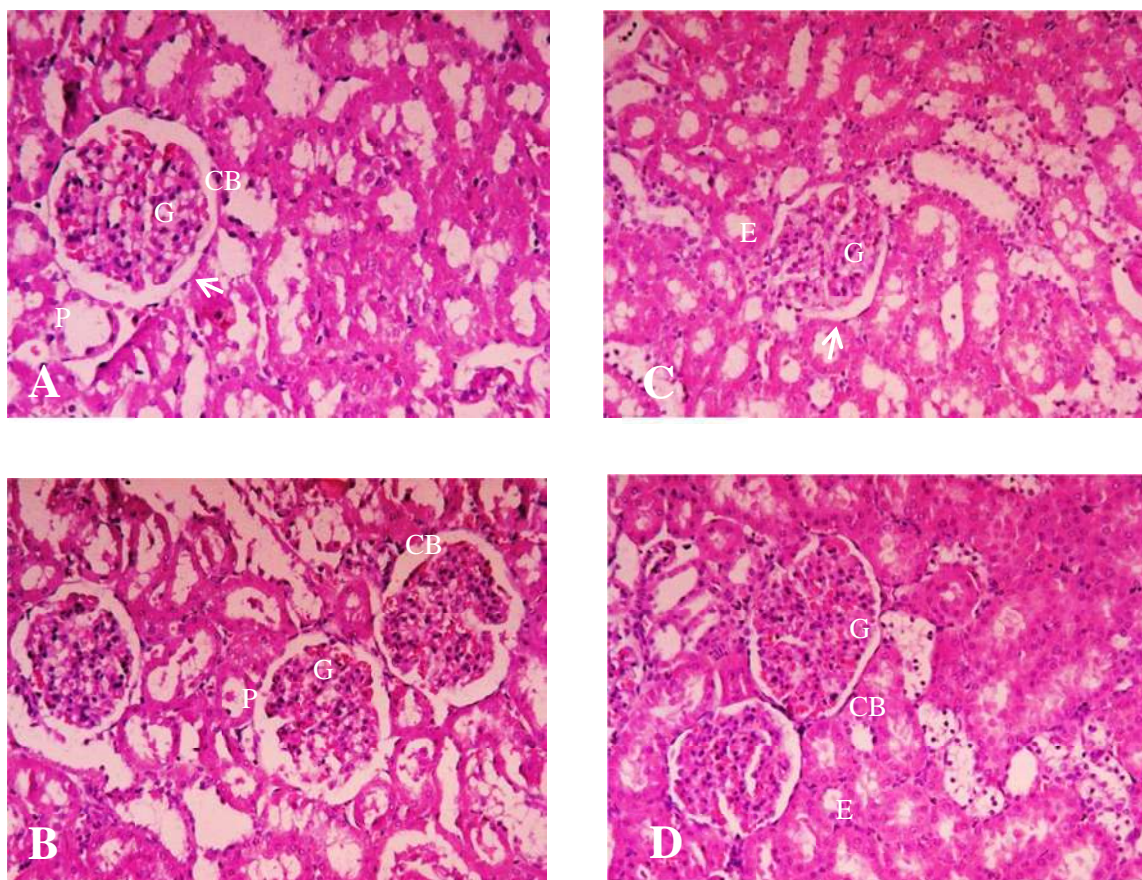


Figura 5. Fotografía de cortes histológicos de riñón de ratas: (A) controles, (B) controles + *E. carlinae*, (C) diabéticas y (D) diabéticas + *E. carlinae*. Cortes de riñones fueron embebidos en parafina y se obtuvieron cortes de 10 μ m de grosor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados a 40X. G: glomérulo; CB: cápsula de Bowman; P: túbulo proximal; E: túbulo proximal edematoso. Las flechas señalan la membrana basal glomerular.

Los grupos controles que recibieron el extracto de *E. carlinae* también conservan la arquitectura normal sin señales inflamatorias (Fig. 5B). Los cortes de riñones de las ratas diabéticas muestran daño en el glomérulo y adelgazamiento de la membrana basal, además de cambios edematosos en los túbulos proximales (Fig. 5C). En las ratas diabéticas que consumieron el extracto de *E. carlinae*, podemos observar un daño menor, ya que el adelgazamiento de la membrana basal no es marcado, sin embargo, persisten los cambios edematosos en los túbulos proximales (Fig. 5D), lo que nos sugiere que el consumo del extracto de *E. carlinae* sólo protege en parte del daño renal que provoca la diabetes.

4. Discusión

La hiperglucemia es la característica principal de la diabetes y se asocia directamente con el desarrollo de sus complicaciones. El mecanismo de daño de la hiperglucemia se encuentra estrechamente relacionado con la elevada producción de especies reactivas a nivel mitocondrial [4]. Se ha considerado al estrés oxidativo como el factor común causante del desarrollo de complicaciones como la nefropatía diabética, y se ha visto que controlando la producción de especies reactivas se disminuye el estrés oxidativo y se normalizan las vías metabólicas alteradas [27]. El daño que pueden provocar las especies reactivas depende de la capacidad antioxidante que tenga la mitocondria para contrarrestarlas y no permitir que predomine una condición de estrés oxidativo. Por lo que para prevenir o controlar el daño renal en los pacientes diabéticos debe tomarse en cuenta el consumo de un compuesto antioxidante que complemente el tratamiento.

En un estudio previo [6], reportamos que el extracto etanólico de *E. carlinae* tiene propiedades hipolipidémicas al ser administrado a ratas diabéticas durante 40 días, aunque la hiperglucemia no es controlada. En un estudio posterior sobre la composición química del extracto etanólico de *E. carlinae* (Capítulo 2), se identificaron compuestos como el α -humuleno, que ha sido reportado con actividad antioxidante y antiinflamatoria [28, 29] por lo que consideramos que el extracto de *E. carlinae* puede tener uso potencial como antioxidante y protector contra el daño oxidativo en la diabetes, y debe ser evaluado.

Las determinaciones *in vitro* de la actividad antioxidante por los métodos DPPH \cdot y ABTS $^{+}$ demuestran que el extracto etanólico de *E. carlinae* tiene una elevada capacidad

para eliminar los radicales libres ($72.5 \pm 19.7\%$ y $91.5 \pm 0.9\%$, respectivamente) sin embargo, con esas determinaciones no se puede asegurar que el extracto tenga la misma eficacia cuando sea consumido por las personas diabéticas. La determinación de fenoles y flavonoides demostró que el extracto etanólico de *E. carlinae* tiene una cantidad similar de estos compuestos a la encontrada en otros extractos reportados con actividad antioxidante, sin embargo, la presencia de éstos no garantiza el efecto *in vivo*, ya que las sustancias presentes en el extracto pueden interactuar de manera diferente dentro de un organismo completo, además, se debe considerar que hay variación en la cantidad y la calidad de los compuestos presentes dependiendo del lugar de recolección de la planta y el tipo de preparación, acuosa o etanólica, que se consuma.

El incremento en la actividad de SOD y CAT en las mitocondrias de riñón de las ratas diabéticas puede deberse a una respuesta para disminuir el estrés oxidativo, aunque sea por un corto periodo. El consumo de *E. carlinae* no modifica esta tendencia, por lo que concluimos que el extracto no tiene efecto directo sobre estas enzimas antioxidantes. Este aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes puede ser la explicación de que no encontremos elevación en los niveles de TBARS en las ratas diabéticas debido a que se está contrarrestando la presencia de estrés oxidativo. Pareciera que nuestros resultados no coinciden con los reportes en donde se muestra que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT están disminuidas en riñón de ratas diabéticas y los niveles de TBARS se encuentran elevados [30], debemos de aclarar que estos estudios han sido realizados en homogenados totales del órgano y no en mitocondrias, y la variación de la fuente de radicales libres es mayor por lo que no podemos compararlos. Aunque en las ratas diabéticas que consumieron el extracto de *E. carlinae* se observa una tendencia a disminuir los niveles de TBARS no llega a ser significativo, posiblemente *in vivo* el extracto tiene menor capacidad de eliminar los radicales libres que causan la lipoperoxidación. Los cortes histológicos de riñón muestran una parcial recuperación de la arquitectura del riñón en las ratas diabéticas que recibieron el tratamiento de *E. carlinae*, esta recuperación puede estar relacionada con la disminución en los niveles de NO observados, o con el contenido de compuestos antiinflamatorios del extracto, como el α -humuleno. También fue observado en estudios anteriores que el consumo del extracto etanólico de *E. carlinae* disminuía los

niveles de creatinina en ratas diabéticas (Capítulo1) atribuido a propiedades diuréticas del extracto. Todos estos datos señalan beneficios del consumo del extracto a nivel renal, sin embargo serían necesarios más estudios para comprobar y relacionar estos efectos como la determinación de la tasa de filtración glomerular.

5. Conclusión

La evaluación *in vitro* del extracto etanólico de *E. carlinae* mostró tener un gran potencial antioxidante, éste no se vió reflejado en las mitocondrias de riñón, probablemente por las transformaciones metabólicas que sufre el extracto al ser consumido de manera oral. Sin embargo, el extracto de *E. carlinae* parece tener un efecto protector al disminuir las alteraciones estructurales que se desarrollan en el riñón, posiblemente por otro mecanismo relacionado con el contenido de compuestos antiinflamatorios encontrados en el extracto y no tanto por la actividad antioxidante.

6. Bibliografía

- [1] World Health Organization. 1999. **“Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications”**. *Report of WHO Consulation*, Geneva, Switzerland.
- [2] Giacco, F. y Brownlee, M. 2010. **Oxidative stress and diabetic complications**. *Circ Res* 107(9):1058-70.
- [3] Méndez, J. D. 2003. **Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus**. *Gac Méd Méx* 139(1):49-55.
- [4] Brownlee, M. 2005. **The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism**. *Diabetes* 54(6):1615-1625.
- [5] Bello, G. M. A. 2006. **Catálogo de plantas medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México**. Libro técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 128 p

- [6] Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Ávila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rojo, C., Boldogh, I. y Saavedra-Molina, A. 2012. **Hypolipidemic activity of *Eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats.** *Biochem Res Int.* 2012:603501.
- [7] Singleton, V. L. y Rossi, J. A. Jr. 1965. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents** *Am. J. Enol. Vitic* 16:144-158.
- [8] Liu, M., Xing, Q. L., Weber, C., Yong, L. Ch., Brown, J. y Liu, R. H. 2002. **Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries.** *J Agric Food Chem* 50:2926:2930.
- [9] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity** *LWT - Food Science and Technology* 28(1):25–30.
- [10] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radic Biol Med* 26(9-10):1231-7.
- [11] Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., García-Parilla, M. C. y Fett, R. 2004. **Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos.** *Rev Bras Ciênc Tecnol Alim* 24(4): 691-693.
- [12] Saavedra-Molina, A. y Devlin, T. M. 1997. **Effect of extra- and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis.** *Amino Acids* 12:293-298.
- [13] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- [14] Buege, J. A. y Aust, S. D. 1978. **Microsomal lipid peroxidation.** *Methods Enzymol* 52:302-310.
- [15] Fossati, P., Prencipe, L. y Berti, G. 1980. **Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine.** *Clinical Chemistry* 26:227-31.
- [16] Green, C., Brand, M. D., Murphy, M. P. 2004. **Prevention of mitochondrial damage as a therapeutic strategy in diabetes.** *Diabetes* 53 110–118

- [17] Guo. L., Hu, W. R., Lian, J. H., Ji, W., Deng, T. y Quian, M. 2006. **Anti-hyperlipidemic properties of CM 108 (a flavone derivative) *in vitro* and *in vivo*.** *Eur J Pharmacol* 551:80:86.
- [18] Babu, P. S., Prabuseenivasan, S. y Ignacimuthu, S. 2007. **Cinnamaldehyde-A potencial antidiabetic agent.** *Phytomedicine* 14:15-22.
- [19] Udayakumar, R., Kasthuriengan, S., Mariashibu, T. S., Rajesh, M., Anbazhagan, V. R., Kim, S.C., Ganapathi, A. y Choi, C.W. 2009. **Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of *Withania somnifera* root and leaf extracts on alloxan-induced diabetic rats.** *Int J Mol Sci* 10(5):2367-82
- [20] Ademiluyi, A. O. y Oboh, G. 2012. **Phenolic-rich extracts from selected tropical underutilized legumes inhibit α -amylase, α -glucosidase, and angiotensin I converting enzyme *in vitro*.** *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 23(1):17-25
- [21] Noumedem, J. A., Mihasan, M., Lacmata, S.T., Tefan, M., Kuate, J. R. y Kuete, V. 2013 **Antibacterial activities of the methanol extracts of ten cameroonian vegetables against gram-negative multidrug-resistant bacteria.** *BMC Complement Altern Med* 13(1):26.
- [22] Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. y Qian, M. 2002. **Free radical scavenging properties of wheat extracts** *J Agric Food Chem* 50(6):1619-24.
- [23] Dey, N., Ghosh-Choudhury, N., Das, F., Li, X., Venkatesan, B., Barnes, J. L., Kasinath, B. S. y Choudhury, G. G. 2010. **PRAS40 acts as a nodal regulator of high glucose-induced TORC1 activation in glomerular mesangial cell hypertrophy** *J Cell Physiol* 225(1): 27–41.
- [24] Sánchez, S., S., Abregú, A., V., Aybar, M. J. y Sánchez R., A. N. 2000. **Changes in liver gangliosides in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Cell Biol Int* 24(12):897-904.
- [25] Forbes, J. M., Coughlan, M. T. y Cooper, M. E. 2008 **Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes.** *Diabetes* 57(6):1446-54.
- [26] Yokozawa, T., Yamabe, N., Kim, H. Y., Kang, K. S., Hur, J. M., Park, Ch. H. y Tanaka, T. 2008. **Protective effects of morroniside isolated from *Corni fructus* against renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Biol Pharm Bul.* 31(7):1422—1428.

- [27] Brownlee, M. 2001. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** *Nature* 414:813–820.
- [28] Tel, G., Oztürk, M., Duru, M. E., Harmandar, M. y Topçu, G. 2010. **Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities.** *Food Chem Toxicol* 48(11):3189-93.
- [29] Zeng, W. C., Zhu, R. X., Jia, L. R., Gao, H., Zheng, Y. y Sun, Q. 2011. **Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphlium affine*.** *Food Chem Toxicol* 49(6):1322-8.
- [30] Mazunder, U. K., Gupta, M. y Rajeshwar Y. 2005. **Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats.** *European Bulletin of Drug Research* 13(1):15-22.

8. DISCUSIÓN GENERAL

La diabetes mellitus (DM) es una amenaza para la población mundial. Cada año, siete millones de personas debutan como diabéticas, es decir, cada 10 segundos aparecen dos nuevos diabéticos [32]. Aunque ahora la mayor incidencia de diabetes se sitúa en el grupo de 20 a 79 años, las cifras de diabetes en la infancia y en la adolescencia están creciendo de manera preocupante [33].

La DM repercute en las personas y en la sociedad, es un trastorno progresivo, de modo que su repercusión sobre la persona varía conforme avanza la enfermedad [34]. El 80% de las muertes debidas a la diabetes, ocurren en países de ingresos bajos o medios, que en su mayoría se encuentran menos preparados para enfrentar esta patología. Los gastos involucrados en el cuidado y manejo de la diabetes afectan no solo a los sistemas de salud sino también a los individuos y la economía de su familia. Aunado a los costos económicos, se encuentran los costos intangibles, o psicosociales, que tienen un gran impacto en la vida de las personas con diabetes y en sus familias, que incluyen estrés, dolor y ansiedad. La expectativa y calidad de vida pueden resultar muy deterioradas por la diabetes [35].

Los gastos médicos de una persona con diabetes son dos a cinco veces más altos que los de una persona sin esta enfermedad, lo que pone en duda si la persona diabética será capaz de solventar los gastos generados por su enfermedad o si en algún momento se verá obligada a dejar el tratamiento farmacológico. Cuando el control glucémico se deteriora en los pacientes diabéticos corren más riesgo de presentar complicaciones microvasculares (enfermedades en los pequeños vasos sanguíneos), entre otras nefropatía, neuropatía y retinopatía, y macrovasculares (enfermedades de los grandes vasos sanguíneos), por ejemplo enfermedad coronaria, infarto al miocardio o accidente cerebrovascular [35].

Por otra parte, no es nuevo que las personas recurran a las plantas con el fin de aliviar sus padecimientos, por ser una alternativa sencilla y económica, además de tener un componente cultural. En el caso de las personas diabéticas sucede lo mismo. Un gran número de plantas medicinales han demostrado tener efectos benéficos sobre las enfermedades cardiovasculares y diabetes a través de efectos como la disminución glucosa, de lípidos, antioxidantes y efectos antiinflamatorios [36]. Las plantas son una fuente de fitoquímicos activos que pueden servir como guía para el desarrollo de nuevos fármacos

más seguros, efectivos y sobre todo económicos [36]. La información etnobotánica mundial reporta que más de 800 plantas pueden ser usadas para el control de la DM, por su actividad hipoglucémica, hipolipidémica o antioxidante cuando se toman oralmente, algunas de estas plantas han sido probadas farmacológicamente y han demostrado tener efecto positivo en el tratamiento de la diabetes en humanos [37].

Eryngium carlinae es una planta con un amplio uso no sólo en Michoacán sino en el país, al ser una planta arvense y ruderal su costo no es elevado, por lo que es accesible a toda la población. La diversidad de usos de esta planta es amplia, sin embargo, para este estudio el efecto sobre los niveles de glucosa, lípidos y antioxidantes fue el punto central. Para estos padecimientos es consumida en cocimientos de la parte aérea de la planta y tomados como agua de uso [30, 31].

En este trabajo se estudió el efecto del consumo oral del extracto etanólico de *E. carlinae*. Se empleó un extracto etanólico debido a que era de éste que se tenían los primeros antecedentes de análisis de la actividad pero sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. En nuestro estudio se administró el extracto etanólico de *E. carlinae* durante 40 días en ratas diabéticas inducidas por STZ, desde los primeros experimentos realizados se pudo observar como el consumo del extracto tenía un efecto benéfico en los animales diabéticos al disminuir el porcentaje de mortalidad ocasionada por la condición diabética, los grupos controles conformados por ratas normales no presentaban mortalidad durante el período de tratamiento, el grupo de ratas diabéticas presentaba una mortalidad alrededor del 50% al término del período experimental, en cambio las ratas diabéticas que consumían el extracto de *E. carlinae* tenían menor porcentaje de mortalidad (27%) (datos no mostrados), en ese momento se desconocía que modificaciones se estarían dando para permitir que mayor número de ratas diabéticas continuaran con vida.

Los registros de los niveles de glucosa realizados durante el período de tratamiento así como los determinados tras un período de ayuno de 12 h al finalizar el tratamiento, nos mostraron que el tratamiento con *E. carlinae* no era capaz de disminuir los niveles de glucosa en las ratas diabéticas, este dato fue corroborado con la determinación del porcentaje de hemoglobina glucosilada (% HbA1c), que nos indicó que durante el tiempo del período experimental las ratas diabéticas habían mantenido niveles elevados de glucosa

(Capítulo 1, Cuadros 1 y 2), además que síntomas característicos como polifagia y polidipsia seguían presentes. Aunque en nuestro estudio el extracto etanólico de *E. carlinae* no tuvo efecto hipoglucémico no se descarta la posibilidad de que en otros modelos de diabetes menos severos si pueda ejercer ésta actividad.

Junto con los resultados obtenidos de los niveles de glucosa, se analizaron niveles de creatinina, ácido úrico, colesterol y triacilglicéridos en suero, observando que todos los parámetros analizados disminuyeron en las ratas que recibieron el extracto de *E. carlinae* (Capítulo 1, Cuadro 3). Debido a que las alteraciones en el metabolismo de los lípidos son frecuentes en los pacientes diabéticos y son la causa del desarrollo de enfermedades cardiovasculares [4, 6, 8], el estudio continuó enfocado a discernir el mecanismo por el cual el extracto era capaz de disminuir los niveles de colesterol y TAG en las ratas diabéticas, por lo que se determinaron los niveles de colesterol-HDL, colesterol no HDL, Apo B y de calculó el índice aterogénico. Sabiendo que en los diabéticos las principales alteraciones en los lípidos son la elevación de los niveles de TAG y colesterol-LDL y la disminución del colesterol-HDL [10], y que en la actualidad se cuenta con fármacos que normalicen estos parámetros como las estatinas, decidimos emplear la atorvastatina como punto de comparación para saber qué tan efectivo podía ser el consumo del extracto de *E. carlinae*. Los resultados de este estudio mostraron que el extracto etanólico de *E. carlinae* era mejor que la atorvastatina para disminuir los niveles de TAG y elevar el colesterol-HDL, y similares en la disminución del colesterol no-HDL (Capítulo 2, Cuadro 3). Finalmente, tanto el extracto como la Atorvastatina reducían el índice aterogénico al mismo valor. Por lo que se considera que la potencia de su acción es similar a la de la atorvastatina.

Es bien sabido que el efecto de las estatinas de disminuir los niveles de colesterol es a través de la inhibición de la biosíntesis de colesterol por la HMG-CoA reductasa y el aumento en el recambio de los LDL-r que favorecen la internalización del C-LDL, ocasionando con esto la disminución del colesterol circulante [38]. Tomando en cuenta esto, decidimos medir la actividad de la HMG-CoA reductasa y los niveles de LDL-r en hígado de las ratas diabéticas tratadas con el extracto, los resultados mostraron que *E. carlinae* no tiene efecto sobre la actividad de esta enzima y tampoco afecta los niveles de

LDL-r (Capítulo 2, Figs. 1 y 2), por lo tanto, el mecanismo a través del cual modifica los niveles de lípidos en sangre debe de ser distinto. Tomando en cuenta que entre los compuestos encontrados en el análisis cromatográfico (Capítulo 2, Cuadro 1) se encuentra el estigmasterol, un esteroide de las plantas que tiene la habilidad de interferir la absorción intestinal de colesterol entre otros efectos [39], sugerimos que el efecto observado del extracto de *E. carlinae* de disminuir los niveles de lípidos en sangre puede ser debido en parte al contenido de estigmasterol. En cuanto a la determinación de Apo B, una apolipoproteína indispensable para el ensamblaje de las LDL y quilomicrones que se ha reportado elevada en condiciones diabéticas [39], se encuentra en niveles normales en las ratas diabéticas que recibieron el extracto de *E. carlinae*, lo que también contribuiría a mantener unos niveles de TAG y C-LDL bajos, sin embargo en nuestro trabajo no podemos asegurar la disminución en Apo B por la gran variación que existe en el grupo diabético, por lo que este aspecto requiere mayor investigación.

Con la información recabada proponemos el siguiente esquema como mecanismo de acción hipolipidémico del extracto etanólico de *E. carlinae* (Fig.1). Como se ha mencionado el estigmasterol identificado en el extracto etanólico de *E. carlinae* como uno de los compuestos mayoritarios, ha sido reportado como un inhibidor de la absorción intestinal de colesterol, ya que lo desplaza de las micelas formadas en el intestino durante el proceso de emulsión de los lípidos y después es pobremente absorbido por el epitelio intestinal debido a diferencias estructurales, por lo que se sugiere que en este trabajo es el responsable de la disminución en los niveles de colesterol circulante. Esta inhibición en la absorción del colesterol proveniente de la dieta si puede tener impacto sobre los niveles de colesterol circulantes ya que las ratas diabéticas consumen de 4 a 5 veces más cantidad de alimento que la que consume una rata normal y de ahí pueden provenir una gran parte de los lípidos que se encuentran en circulación. Posterior a la absorción intestinal de los lípidos que constituyen a las micelas, éstos se encuentran con la enzima colesterol Acil-CoA-aciltransferasa (ACAT) la cual esterifica el colesterol para formar quilomicrones que serán liberados hacia el sistema linfático para que lleguen a circulación, esta enzima también se ha visto afectada por la presencia de esteroides vegetales por lo que quedaría pendiente su evaluación. También en los enterocitos se encuentra un transportador

denominado ABC encargado del eflujo del colesterol hacia la luz del intestino, se ha reportado que su expresión puede verse afectada por la presencia de esteroides vegetales aumentando el eflujo de colesterol.

Debido a que no hay disminución en la actividad de la HMG-CoA reductasa ni modificaciones en los niveles del LDL-r, descartamos que el extracto de *E. carlinae* tenga un mecanismo de acción similar al de las estatinas.

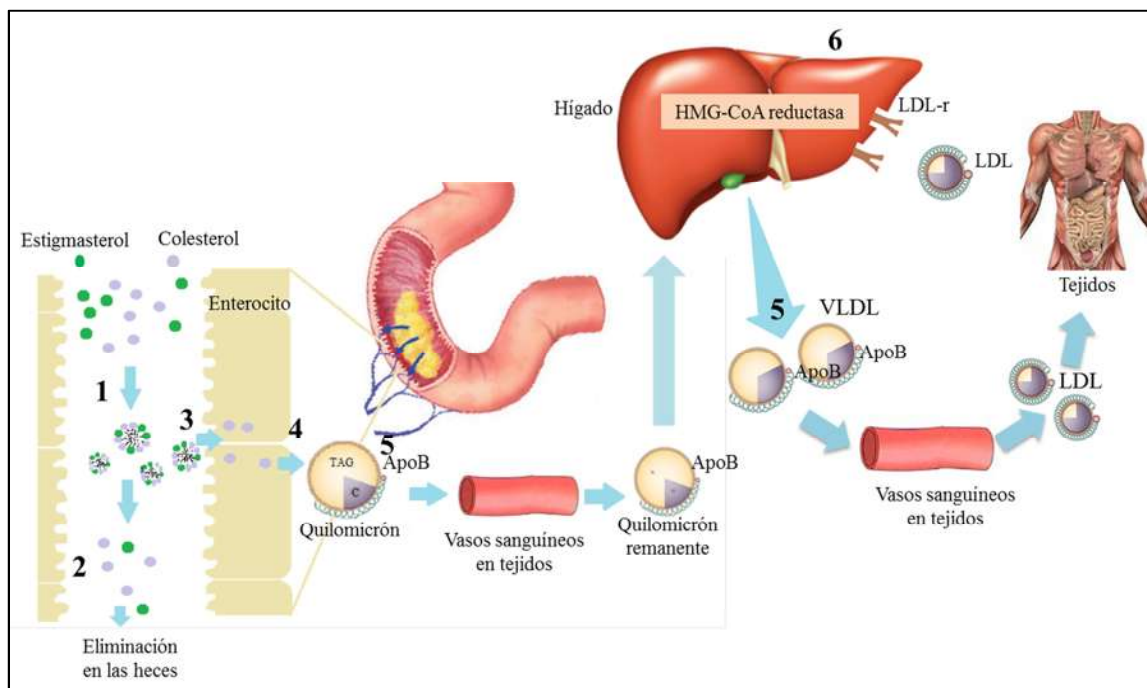


Figura.1 Mecanismo propuesto de la acción hipolipidémica del extracto etanólico de *E. carlinae*. (1) El estigmasterol, presente en el extracto de *E. carlinae*, por ser más lipofílico que el colesterol de la dieta, lo desplazaría desde las micelas ocupando su lugar durante el proceso de emulsificación de los lípidos en el intestino delgado por acción de las sales biliares. (2) El colesterol proveniente de la dieta, no emulsionado, no se absorberá y se eliminará en las heces. (3) Cuando las micelas formadas llegan hasta las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado, las micelas se disocian liberando el colesterol, estigmasterol, ácidos grasos y demás componentes. La cantidad de colesterol que se absorba será más baja y el estigmasterol es muy poco absorbido por las células del intestino debido a la diferencia estructural con el colesterol. (4) Hay menor cantidad de colesterol absorbido para ser empacado en quilomicrones. (5) Los niveles menores de colesterol no-HDL en sangre (corresponde al colesterol de los quilomicrones, VLDL, IDL, LDL) observados en los experimentos, significan que hay menor cantidad de colesterol en las partículas de quilomicrones y VLDL circulantes probablemente debido a una menor

disponibilidad de colesterol proveniente de la dieta, junto con niveles normales de Apo B significa que hay menor cantidad de partículas circulando que las que se encontrarían en la condición diabética. (6) El consumo del extracto no afectó la actividad de la HMG-CoA ni la expresión de LDL-r.

En el análisis cromatográfico realizado en el extracto se encontraron varios sesquiterpenos con posible actividad antioxidante y antiinflamatoria (Capítulo 2, Cuadro 1), por lo que se decidió evaluar la capacidad antioxidante del extracto por medio de determinaciones *in vitro*. Tomando en cuenta que en la diabetes, la hiperglucemia produce una condición de estrés oxidativo a través de la elevada producción de especies reactivas y siendo el daño oxidativo en el riñón una de las causas del desarrollo de nefropatía diabética [19], se analizó el efecto del consumo del extracto sobre algunos indicadores de daño oxidativo en riñón, ya que de encontrar actividad antioxidante resultaría en un mayor beneficio para los diabéticos que lo consuman.

Cabe mencionar que aunque el objetivo central del trabajo fue estudiar el efecto del consumo del extracto etanólico de *E. carlinae* preparado de plantas colectadas en la localidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro, se realizó un análisis de extractos elaborados con plantas de las localidades de Las Ranas y Cointzio, así como preparaciones acuosas y etanólicas, con la finalidad de comparar los compuestos presentes en ellas encontrando que los componentes mayoritarios identificados por CG-EM fueron los mismos para las tres plantas sólo que la cantidad presente era distinta debido posiblemente a variaciones en la materia orgánica donde crecían las plantas. Se presentaron problemas al tratar de analizar los compuestos acuosos por CG-EM, sin embargo en las determinaciones de fenoles y flavonoides, así como en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH[•] y ABTS^{•+}, siempre fueron mejores los extractos etanólicos que los acuosos, de la misma manera se observó que ninguna fracción del extracto poseía la misma actividad que el extracto completo.

Los resultados de las determinación *in vitro* mostraron que el extracto etanólico de *E. carlinae* tenía gran potencial antioxidante (Capítulo 3, Cuadro 1 y 2) por su contenido de fenoles y flavonoides, además por su capacidad de eliminar los radicales DPPH[•] y

ABTS⁺, lo que resultaba prometedor. Sin embargo al ser analizado sobre la lipoperoxidación, y las enzimas antioxidantes SOD y CAT en las mitocondrias de ratas diabéticas, el extracto mostró no tener acción. Estos resultados muestran que el potencial antioxidante de una planta determinado mediante pruebas *in vitro* no puede ser extrapolada directamente a estudios *in vivo* esperando encontrar el mismo efecto, esto también ha sido reportado por otros autores [40].

Cuando hay deterioro en la función renal, esta se ve reflejada como una tasa de filtración glomerular reducida, siendo a la vez un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones macrovasculares [6]. En las ratas diabéticas que consumieron el extracto de *E. carlinae* se observó una disminución en los niveles de creatinina (Capítulo 1 , Tabla 1), una sustancia que puede encontrarse elevada en la sangre cuando hay daño renal ante la imposibilidad de poder eliminarla por la orina; también se observaron niveles reducidos de NO en las mitocondrias de riñón de las ratas diabéticas que consumieron el extracto, los cuales se encontraron elevados en ratas diabéticas y en el análisis histológico de los riñones se observó una recuperación parcial en la estructura de renal de las ratas que consumieron el extracto, por lo que estos datos nos indican que el extracto etanólico de *E. carlinae* puede tener efecto protector retrasando la aparición del daño renal.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

El extracto etanólico de *E. carlinae* no mostró actividad hipoglucémica, sin embargo presentó un efecto hipolipidémico y antioxidante. Lo anterior demuestra el beneficio de estos extractos sobre el perfil de lípidos y el retardo de la progresión del daño renal, que conlleva a mejorar la calidad de vida de los diabéticos.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto hipoglucémico de *E. carlinae* empleando un modelo de diabetes menos severo, es probable que bajo otras condiciones el extracto muestre efecto hipoglucémico.
- Determinar si se presentan interacciones farmacológicas cuando el extracto etanólico de *E. carlinae* es consumido a la par con un hipoglucemiante oral, esto debido a que este trabajo demuestra que puede tener beneficios sobre el perfil de lípidos y el daño renal aunque no disminuya los niveles de glucemia.
- Determinar los niveles de Apo B en ratas diabéticas para corroborar que el extracto de *E. carlinae* es capaz de normalizar los niveles de esta apolipoproteína.
- Realizar determinaciones de la absorción de colesterol proveniente de la dieta empleando [C^{14}] colesterol en ratas diabéticas que sean administradas con el extracto etanólico de *E. carlinae*, realizar mediciones en suero y heces, para estimar el grado de inhibición de la absorción de colesterol que presenta el extracto.
- Medir la actividad de la enzima colesterol Acil-CoA-aciltransferasa (ACAT) y la expresión del transportador ABC en enterocitos de las ratas diabéticas administradas con el extracto etanólico de *E. carlinae*, ya que se ha visto que algunos esteroides de plantas pueden inhibir la actividad de la ACAT provocando menor esterificación del colesterol para formar quilomicrones y también aumentan la expresión del transportador ABC para aumentar el eflujo de colesterol.
- Analizar cortes histológicos de hígado en busca de cambios estructurales que puedan estar relacionados con el aumento de tamaño del órgano observado en las ratas diabéticas que consumieron el extracto etanólico de *E. carlinae*.
- Determinar niveles de lipoperoxidación en suero de ratas diabéticas administradas con *E. carlinae* en busca de efecto antioxidante a ese nivel, donde es importante para impedir la oxidación de lípidos circulantes.

11. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- [1] Diabetes Atlas 2012. Quinta edición. **Tabla de resumen por país: cálculos para 2012.** Producido por la Federación Internacional de Diabetes.
- [2] NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- [3] World Health Organization. 1999. **“Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications”**. *Report of WHO Consulation*, Geneva, Switzerland.
- [4] American Diabetes Association. 2012. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** *Diabetes Care* 35(1):S64:S71.
- [5] Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT) Secretaria de Gobernación.
- [6] Forbes, J. M. y Cooper, M. E. 2013. **Mechanisms of diabetic complications.** *Physiol Rev* 93(1):137-88.
- [7] Olorunnisola, O. S., Bradley, G. y Afolayan, A. J. 2012. **Protective effect of *Tulbaghia violacea* Harv. on aortic pathology, tissue antioxidant enzymes and liver damage in diet-induced atherosclerotic rats.** *Int J Mol Sci.* 13(10):12747-60.
- [8] Bardini, G., Rotella, C. M. y Giannini, S. 2012. **Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications.** *Rev Diabet Stud* 9(2-3):82-93.
- [9] Bloomgarden, Z. T. 2003. **Perspectives on the news. Approaches to cardiovascular disease and its treatment.** *Diabetes Care* 26:3342–3348.
- [10] Taskinen, M. R. 2003. **Diabetic dyslipidemia: from basic research to clinical practice.** *Diabetologia* 46:733–749.
- [11] Valdemar, L., Rodríguez, M., Bermúdez, V., Leal, E., Bermudez, F., Cabrera, M., Mengual, E., Silva, C., Ameli, A. y Toledo, A. 2007. **Tratamiento farmacológico de la obesidad: presente, pasado y futuro.** *Archivos Venezolanos de Farmacobiología y Terapéutica* 26(1):10-20.
- [12] Garrido P., A. y Teijón R., J. M. 2005. **Fundamentos de Bioquímica Metabólica.** 1ª ed. Alfaomega Grupo Editor. México. pp 71, 72, 125, 126, 129, 130, 142.

- [13] Fitzgerald, M. L., Mujawar, Z. y Tamehiro, N. 2010. **ABC transporters, atherosclerosis and inflammation.** *Atherosclerosis* 211(2):361-70.
- [14] Espondaburu, O. R. 2006. **Hipertrigliceridemia: influencia sobre parámetros que estiman el transporte reverso del colesterol.** *Acta bioquím. clín. Latinoam* 40(2):165-172.
- [14a] Davinson, M. H. y Jacobson, T. A. 2001. **How statins work: The development of cardiovascular disease and its treatment with 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase inhibitors.** *Cardiology Clinical Updates - © 2001 Medscape, Inc.* <http://www.oocities.org/heartland/ridge/4839/statins.html> (Accesada en febrero de 2013).
- [15] Tamilarasan, K. P., Temmel, H., Das1, S. K., Al Zoughbi, W., Schauer, S., Vesely, P. W. y Hoefler, G. 2012. **Skeletal muscle damage and impaired regeneration due to LPL-mediated lipotoxicity** *Cell Death and Disease* 3:e354.
- [16] Ptilovanciv, E. O. N., Fernandes, G. S., Teixeira, L. C., Reis, L. A., Pessoa, E. A., Convento, M. B., Simões, M. J., Albertoni, G. A., Schor, N. y Borges, F. T. 2013. **Heme oxygenase 1 improves glucoses metabolism and kidney histological alterations in diabetic rats.** *Diabetology & Metabolic Syndrome* 5:3.
- [17] O'Bryan, G. T. y Hostetter, T. H. 1997. **The renal hemodynamic basis of diabetic nephropathy.** *Semin Nephrol* 17(2):93-100.
- [18] Rasch, J. O. R. y Nørgaard, R. 1983. **Renal enlargement: Comparative autoradiographic studies of 3H-thymidine uptake in diabetic and uninephrectomized rats** *Diabetologia* 25(3):280-287.
- [19] Kim, J., Shon, E., Kim, C. S. y Kim, J.S. 2012. **Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin.** *Exp Diabetes Res.* 2012:210821.
- [20] Niedowicz, D. M. y Daleke, D. L. 2005. **The role of oxidative stress in diabetic complications** *Cell Biochemistry and Biophysics* 43(2):289-330.
- [20a] Anaya, A. L., Espinosa-García, F. y Cruz-Ortega, R. 2001. **Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación.** Instituto de Ecología. Plaza y Valdéz Editores. Pág. 165.
- [21] Yadav, P., Sarkar, S. y Bhatnagar, D. **Action of *capparis decidua* against alloxan-induced oxidative stress and diabetes in rat tissues.** *Pharmacol Res* 36(3):221-8.

- [22] Sundaram, R. K., Bhaskar, A., Vijayalingam, S., Viswanathan, M., Mohan, R., y Shanmugasundaram, K. R. 1996. **Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications.** *Clin. Sci. (Lond)*. 90: 255–260.
- [23] Sefi, M., Fetoui, H., Soudani, N., Chtourou, Y., Makni, M. y Zeghal, N. 2012. ***Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products** *Pathology - Research and Practice* 208(3):157-162.
- [24] Calapai, G. y Caputi, A. P. 2007. **Herbal medicines: can we do without pharmacologist?** *Evid Based Complement Alternat Med* 4(1):41-3.
- [25] Meenalshi, P., Bhuvaneshwari, R., Ahalliya, R. M., Thirumoorthi, L., Chinna, G. D., Janardhanan, J. M. y Kanniappan G. V. 2009. **Antidiabetic activity of ethanolic extract of *Zelaya decandra* in alloxan-induced diabetic rats.** *Appl Biochem Biotechnol* 162(4):1153-9.
- [26] Lee, S.J., Zhang, G. F., Sung, N. J. 2011. **Hypolipidemic and hypoglycemic effects of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Nutr Res Pract* 5(4):301-7.
- [26a] Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. 2005. **Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes.** *Journal of Ethnopharmacology* 99:325–348
- [27] Esquivel-Gutiérrez, E. R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M. A., Saavedra-Molina, A., Salgado-Garciglia, R. 2012. **Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas.** *Biológicas* 14(1):45-52.
- [28] Robbins, R. 2003. **Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology.** *J. Agric. Food Chem* 51:2866-2887.
- [29] Halliwell, B. 2007. **Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?** *Cardiovascular Research* 73:341–347.
- [29a] Alturfan, A. A., Emekli-Alturfan, E., Uslu, E. 2009. **Consumption of pistachio nuts beneficially affected blood lipids and total antioxidant activity in rats fed a high-cholesterol diet.** *Folia Biol (Praha)* 55(4):132-6.

- [30] Bello, G. M. A. 2006. **Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México.** Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.
- [31] Bello G., M. A. 1993. **Plantas útiles no maderables de la Sierra purépecha, Michoacán, México,** INIFAP. México. Folleto Técnico No 10. 115 p.
- [32] American Diabetes Association position statement: **evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications.** 2002. *J Am Diet Assoc* 102:109-118.
- [33] American Diabetes Association. 2000. **Type 2 diabetes in children and adolescents.** *Diabetes Care* 3:381-389.
- [34] Rizza, R. 2006. **Effects of duration of type 2 diabetes mellitus on insulin secretion.** *Endocr Pract* 12:388-393.
- [35] Diabetes Atlas 2006. Tercera edición. Producido por la Federación Internacional de Diabetes.
- [36] Wang, H. X. y Ng, T. B. 1999. **Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities.** *Life Sciences* 65:2663-2677.
- [37] Udayakumar, R., Kasthuriengan, S., Mariashibu, T. S., Rajesh, M., Anbazhagan, V. R., Kim, S.C., Ganapathi, A. y Choi, C.W. 2009. **Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of *Withania somnifera* root and leaf extracts on alloxan-induced diabetic rats.** *Int J Mol Sci* 10(5):2367-82
- [38] Carmena, R., y Betteridge, D. J. 2004. **Statins and diabetes.** *Semin Vasc Med* 4(4):321-32.
- [39] Batta, A. K., Xu, G., Bollineni, J. S., Shefer, S. y Salen, G. 2005. **Effect of high plant sterol-enriched diet and cholesterol absorption inhibitor, SCH 58235, on plant sterol absorption and plasma concentrations in hypercholesterolemic wild-type Kyoto rats.** *Metabolism* 54(1):38-48.
- [40] Veskoukis, A. S., Kyparos, A., Nikolaidis, M. G., Stagos, D., Aligiannis, N., Halabalaki, M., Chronis, K., Goutzourelas, N., Skaltsounis, L. y Kouretas, D. 2012. **The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract *in vitro* do not**

correspond *in vivo* using exercise as an oxidant stimulus *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2012.