

Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Efecto de *Kalanchoe pinnata* en ratas Wistar expuestas a una solución concentrada de sacarosa por vía oral

Tesis que para obtener el grado de
Licenciado en Ciencias Químicas

Presenta:

José Gerardo Agosto

Directora:

Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca

2023



Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 10 de noviembre del 2023

UNPA/LCQ/270/2023

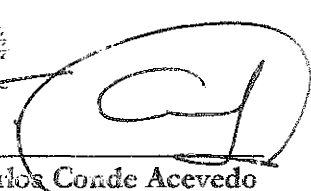
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan
P R E S E N T E

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis presentado por el egresado de la Licenciatura en Ciencias Químicas JOSÉ GERARDO AGOSTO y que lleva por título "Efecto de Kalanchoe pinnata en ratas Wistar expuestas a una solución concentrada de sacarosa por vía oral" para su presentación y defensa por parte del egresado y así obtener el título de Licenciado en Ciencias Químicas, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

Sin otro asunto en particular me despido cordialmente agradeciendo la atención a la presente.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jí


UNPA
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jí
Dr. José Carlos Conde Acevedo
Jefe de Carrera
Licenciatura en Ciencias Químicas
CAMPUS TUXTEPEC


Vo.Bo. Dra. Tania Zúñiga Marroquín
Encargada de despacho
Vicerrectoría Académica
Universidad del Papaloapan

UNPA
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jí
VICE-RECTORIA
ACADEMICA

C.c.p. Dra. Cecilia Guadalupe Navarro Moreno. Directora de tesis. Para su conocimiento.
C.c.p. José Gerardo Agosto. Tesisista egresado. Para su conocimiento
C.c.p. Archivo

OAXACA

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec

Av. Ferrocarril S/N. Col. Ciudad Universitaria. Loma Bonita. Oaxaca C.P. 68400

Circuito Central N° 200. Col. Parque Industrial C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 575 9240



Universidad del Papaloapan

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 10 de noviembre del 2023

UNPA/LCQ/271/2023

Asunto: Designación de sinodales

C. José Gerardo Agosto

Pasante de la carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas

PRESENTE

Por este medio le informo la propuesta de la jefatura de carrera de los profesores investigadores que fungirán como sinodales en el examen de defensa de tesis para obtener el título de Licenciado en Ciencias Químicas.

El jurado del examen profesional estará compuesto por los siguientes profesores investigadores:

Presidente: Dra. Roxana Martínez Pascual

Secretario: Dr. Omar Viñas Bravo

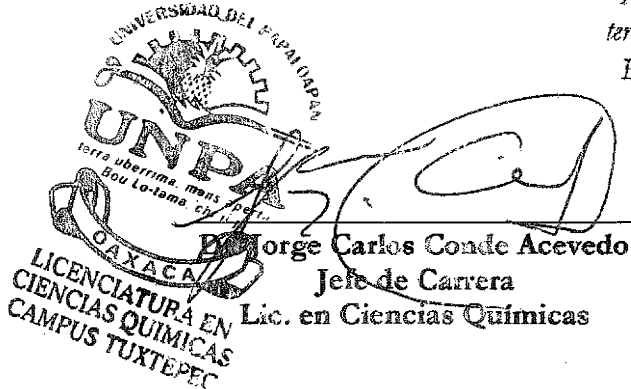
Vocal: Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno

Primer Suplente: Dra. Martha Emilia Poisot Vázquez

Segundo Suplente: Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Sin otro asunto en particular me despido cordialmente agradeciendo la atención a la presente.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



C.c.p. Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno. Directora de tesis para su conocimiento.
C.c.p. José Gerardo Agosto. Tesista egresado. Para su conocimiento
C.c.p. Archivo

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La Tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Un mundo nuevo no puede existir sin la destrucción del antiguo primero.

- *Gurú Laghima.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco al universo, creador(a) de todo, por darme la fuerza, paciencia e inteligencia necesaria para poder completar este proyecto.

A mi tata Dulce⁺, por todo el amor que me dio.

A mis padres y mi hermana, por ser mis pilares en la vida, apoyarme en todas mis decisiones y no dejarme solx, por su apoyo incondicional en cada una de las etapas que han forjado mi crecimiento personal y profesional.

En especial a mi madre, por ser mi luz en mis momentos más oscuros; todo esto es por y para ti.

A la Dra. Navarro por darme las herramientas necesarias para poder culminar la tesis; a Leticia Guadalupe Navarro Moreno por confiar en mí a lo largo de todo este proyecto, por la amistad y confianza brindada, por no dejar que me rindiera, por su paciencia y por todos los momentos vividos que llevo en la mente y en el corazón.

Al Dr. Omar Viñas por sus enseñanzas a lo largo de la carrera y el apoyo dado durante la etapa experimental.

A las químicas Leti y Bety, por el apoyo y los consejos que me dieron en mi etapa experimental.

A mis sinodales, por tomarse el tiempo necesario para corregir y orientarme en este trabajo.

A mi besti Yasenqui Rodríguez, por apoyarme y hacer que la carrera fuera una experiencia mucho más grata y por todas las aventuras que pasamos juntxs. Te quiero mucho amix.

A mis babies Lucina e Itzel, por todas nuestras aventuras, por todo su apoyo, por su amistad incondicional, las quiero demasiado.

A mi Marielita, por ser estar presente todo este tiempo.

A mi amistades Cristóbal, Selma, Enrique; por estar en los momentos más difíciles, por no dejar que me diera por vencido y por creer en mí.

A mis compañerxs de laboratorio Sari, Montse, Joaquín, Felipe, Brandon y David, por su amistad y ayuda.

Al vicerrector, Héctor Arjona, por su amistad y apoyo.

DEDICATORIA

Me dedico este trabajo a mí mismo, porque es una demostración de lo que puedo lograr.

RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo el estudio del efecto de una solución de sacarosa al 20% administrada a ratas Wistar macho y hembra. De la misma manera, se estudió el efecto protector de un extracto crudo de hojas de la planta *Kalanchoe pinnata* conocida como “mala madre” y a la que se le han adjudicado gran variedad de propiedades, entre ellas, antiinflamatorias y antioxidantes. Para llevar a cabo lo anterior se determinó la composición fotoquímica y las propiedades antioxidantes del extracto. Se encontró que las hojas de *Kalanchoe pinnata*, poseen taninos, flavonoides, terpenoides, esteroides y glucósidos. En cuanto a su actividad antioxidante, se observó que poseen poder reductor, capacidad para estabilizar radicales libres, un alto contenido fenólico, capacidad para descomponer peróxido de hidrógeno, así como para realizar el barrido de radicales superóxido evaluado.

Para llevar a cabo los ensayos con los animales de experimentación, se establecieron cuatro grupos experimentales. Los ensayos fueron divididos en dos: los fisiológicos incluyendo la determinación de glucosa en sangre, examen general de orina (EGO), pesos corporal y de los órganos, y la proteína C reactiva; y los bioquímicos, dentro de los que se determinaron las actividades de tres enzimas antioxidantes: Glutatión S-transferasa (GST), Catalasa (CAT) y Superóxido dismutasa (SOD), la actividad de la Citocromo C-oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs).

Entre los resultados obtenidos, en los ensayos con los grupos experimentales se obtuvieron diferencias significativas en todas las determinaciones realizadas. En general, se observó que la administración de la solución de sacarosa alteró el comportamiento de la mayoría de las pruebas realizadas y que en algunos casos éstas alteraciones pudieron ser revertidas al utilizar el extracto de hojas de la planta como un posible tratamiento. Lo anterior indica que, la familia de metabolitos presentes en las hojas de *Kalanchoe pinnata* (KP) puede contrarrestar los efectos inducidos por la alta concentración de glucosa en sangre proveniente de una dieta elevada de azúcar (sacarosa).

ABSTRACT

In this study, the effect of a 20% sucrose solution administered to male and female Wistar rats was investigated. Similarly, the protective effect of a crude extract from the leaves of the *Kalanchoe pinnata* plant, known as "mala madre" and attributed with a variety of properties including anti-inflammatory and antioxidant, was studied. To accomplish this, the phytochemical composition and antioxidant properties of the extract were determined.

It was found that *Kalanchoe pinnata* leaves contain tannins, flavonoids, terpenoids, steroids, and glycosides. Regarding their antioxidant activity, they exhibited reducing power, the ability to stabilize free radicals, a high phenolic content, the capacity to decompose hydrogen peroxide, as well as the ability to scavenge superoxide radicals.

Four experimental groups were established with regard to the animal experiments. The experiments were divided into two categories: physiological, including blood glucose determination, a general urinalysis, body and organ weights, and C-reactive protein; and biochemical, within which the activities of three antioxidant enzymes were determined: Glutathione S-transferase (GST), Catalase (CAT), and Superoxide Dismutase (SOD), as well as the activity of Cytochrome C oxidase and the generation of Reactive Oxygen Species (ROS).

Among the results obtained, significant differences were observed in all measurements conducted in the experimental groups. Overall, it was observed that the administration of the sucrose solution altered the behavior of most of the tests performed, and in some cases, these alterations could be reversed by using the leaf extract of the plant as a potential treatment. This indicates that the family of metabolites present in *Kalanchoe pinnata* (KP) leaves may counteract the effects induced by the high concentration of glucose in the blood resulting from a high-sugar (sucrose) diet.

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
AACE	Asociación Estadounidense de Endocrinólogos Clínicos
Abs	Absorbancia
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADP	Adenosín fosfato
AGL	Ácidos grasos libres
ATP	Adenosín trifosfato
ATP III	Programa Nacional de Educación sobre el Panel de Colesterol de Tratamientos para Adultos III
BA	Bebidas azucaradas
CAT	Catalasa
CDP	Capacidad para descomponer peróxido de hidrógeno
CFF	Cromatografía en capa fina
CFT	Contenido fenólico total
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃COOH	Ácido acético
CHCl₃	Cloroformo
CHOs	Carbohidratos
CO₂	Dióxido de carbono
Co-A	Coenzima-A
CSRL	Capacidad máxima para captar radicales libres
CTE	Cadena de transporte de electrones
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato
DHsa	Deshidrogenasa
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético,
EGO	Examen general de orina
EKP	Extracto acuoso de las hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i>
ERACP	Extracción rápida de agua caliente presurizada
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno

EROs	Especies reactivas de oxígeno
ESANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
FeCl₃	Cloruro férrico
FID	Federación de Diabetes Internacional
Fruct-6-P	Fructosa-6-fosfato
g	Gramos
GDM	Diabetes Mellitus Gestacional
Gli-3-p	Gliceraldehído-3-fosfato
GLO	L-gulono-γ-lactona oxidasa
Glu-6-P	Glucosa-6-fosfato
GLUT	Transportador de glucosa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación sulfihidrido transferasa
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IL1	Interleucina-1
IR	Insulino resistencia
I-R	Isquemia reperusión
JMAF	Jarabe de maíz alto en fructosa
JNK	Jun N-Terminal Kinase
K	<i>Kalanchoe</i>
KP	<i>Kalanchoe pinnata</i>
K₃Fe (CN)₆	Ferrocianuro de potasio
kJ	kilo Jules
KMnO₄	Permanganato de potasio
KOH	Hidróxido de potasio
LPL	Lipoproteína lipasa
MCP-1	Proteína quimiatractante de monocitos
MDA	Malondialdehído
MeOH	Metanol
mL	Mililitros
Na₂CO₃	Carbonato de sodio

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-κB	Factor nuclear de transcripción Kb
nm	Nanómetros
O₂	Oxígeno molecular
O₂^{•-}	Radical superóxido
OH	Hidroxilo
OMS	Organización mundial de la salud
Pb(CH₃COO)₂	Acetato de plomo
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Proteína-C reactiva
PFK1	Fosfofructosaquinasa-1
PGA	Glucosilación avanzada
Pi	Fosforo inorgánico
PQC	Proteína quinasa
RL	Radicales libres
rpm	Revoluciones por minuto
RS	Radicales superóxido
SOD	Superóxido dismutasa
TAG	Triacilgliceroles
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ΔG°	Energía libre de Gibbs

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bebidas azucaradas	2
1.2 Metabolismo oxidativo: Degradación de glucosa y fructosa	4
1.2.1 Glucosa	4
1.2.2 Fructosa	8
1.3 Composición de las bebidas azucaradas	12
1.4 Enfermedades metabólicas	14
1.5 Obesidad	17
1.6 Hiperglucemia	19
1.7 Inflamación y Estrés oxidativo	21
1.8 Diabetes	25
1.9 Medicina tradicional.....	27
1.9.1 Plantas medicinales	29
1.9.2 Género <i>Kalanchoe</i>	29
CAPITULO 2: ANTECEDENTES	32
2.1 Roedores expuestos a altas concentraciones de azúcar	33
2.2 Diabetes e hiperglucemia	33

2.3	<i>Kalanchoe pinnata</i>	35
CAPITULO 3: JUSTIFICACIÓN.....		40
CAPÍTULO 4: HIPÓTESIS		42
CAPITULO 5: OBJETIVOS		44
5.1	General	45
5.2	Específicos	45
CAPÍTULO 6: METODOLOGÍA.....		46
6.1	Metodología cualitativa para la determinación de fitoconstituyentes presentes en <i>Kalanchoe pinnata</i>	47
6.1.1	Recolección de <i>Kalanchoe pinnata</i>	47
6.1.2	Extracción asistida por ultrasonido	47
6.1.3	Extracción rápida de agua caliente presurizada	48
6.1.4	Ensayos químicos para la determinación de fitoconstituyentes presentes en <i>Kalanchoe pinnata</i>	48
6.2	Metodología para la evaluación de las propiedades antioxidantes de <i>Kalanchoe pinnata</i>	49
6.2.1	Poder reductor de los antioxidantes	49
6.2.2	Actividad estabilizante del radical DPPH.....	49
6.2.3	Contenido de fenoles totales	49
6.2.4	Habilidad para descomponer peróxido de hidrógeno	50
6.2.5	Barrido de radicales superóxido.....	50
6.3	Metodología para los grupos de ensayo biológicos	51
6.3.1	Examen general de orina (EGO)	51
6.3.2	Proteína C-reactiva (PCR) como indicador de procesos inflamatorios.....	53
6.3.3	Determinación de proteína total por el método de Lowry	54
6.3.4	Especies reactivas de oxígeno (EROs).....	55
6.3.5	Actividad de la enzima Catalasa (CAT)	56

6.3.6	Actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD)	56
6.3.7	Actividad de la Citocromo-C oxidasa (Cit-Cox)	57
6.3.8	Actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa (GST)	58
6.4	Análisis estadístico	58
Capítulo 7: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		59
7.1	Determinación de fitoconstituyentes y evaluación de la actividad antioxidante de <i>Kalanchoe pinnata</i>	60
7.1.1	Material vegetal.....	60
7.1.2	Extracción y estudios fitoquímicos.....	61
7.1.3	Estudio fitoquímico	63
7.1.4	Cromatografía en capa fina.....	64
7.1.5	EAU con un sistema de disolvente de hexano al 100%.....	66
7.2	Evaluación de la actividad antioxidante	71
7.2.1	Poder reductor.....	72
7.2.2	Actividad antirradical DPPH.....	73
7.2.3	Contenido de fenoles totales	75
7.2.4	Habilidad para descomponer peróxido de hidrógeno.	76
7.2.5	Barrido de radicales Superóxido	77
7.3	Grupos expuestos a alta concentración de azúcar y tratados con extractos acuosos de hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i>	80
7.3.1	Ensayos fisiológicos.....	80
7.3.2	Glucosa en sangre	80
7.3.3	Peso corporal	83
7.3.4	Peso de los órganos	87
7.3.5	Examen general de orina	92
7.3.6	Proteína-C Reactiva (PCR)	97

7.4	Ensayos bioquímicos en ratas wistar macho	99
7.4.1	Especies reactivas de oxígeno	99
7.4.2	Glutación-S Transferasa	103
7.4.3	Catalasa	106
7.4.4	Superóxido dismutasa	108
7.4.5	Citocromo-C oxidasa	111
7.5	Ensayos bioquímicos en ratas wistar hembra	115
7.5.1	Especies reactivas de oxígeno	115
7.5.2	Glutación-S Transferasa	117
7.5.3	Catalasa	119
7.5.4	Superóxido dismutasa	121
7.5.5	Citocromo-C oxidasa	123
7.6	Comportamiento bioquímico en machos y hembras	126
Capítulo 8: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		129
Conclusiones		130
Perspectivas		131
BIBLIOGRAFÍA		132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de bebidas azucaradas (Paredes-Serrano, 2016).	2
Tabla 2. Alimentos procesados principales que contienen fructosa	13
Tabla 3. Componentes de enfermedades metabólicas según la ATP III, OMS, AACE e IDF.....	15
Tabla 4. Especies Reactivas de Oxígeno (Phaniendra, et. al. 2015).....	24
Tabla 5. Productos Naturales bioactivos y fuente de proveniencia.	28
Tabla 6. Parámetros establecidos para la identificación de metabolitos presentes en <i>Kalanchoe pinnata</i> . ..	48
Tabla 7. Fitoconstituyentes de las hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i> ERACP y EAU.....	63
Tabla 8. Compuestos determinados en hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i> mediante Extracción Asistida por Ultrasonido, empleando diferentes sistemas de disolventes.....	67
Tabla 9. Compuestos fitoquímicos determinados por Extracción Asistida por Ultrasonido usando dos sistemas diferentes.....	69
Tabla 10. Porcentaje obtenido de la actividad estabilizante de radicales libres con el extracto de las hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i> , usando como referencia ácido ascórbico.....	73
Tabla 11. Concentración de fenoles totales obtenida del extracto de KP a 40 mg/mL con ayuda de la ecuación de la recta de la curva de calibración con el ácido gálico (n=3).	75
Tabla 12. Capacidad para descomponer H ₂ O ₂ en un extracto acuoso de las hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i> a diferentes concentraciones.	76
Tabla 13. Pesos corporales de ratas Wistar al inicio y al final del tratamiento experimental.....	83
Tabla 14. Pesos corporales de ratas Wistar hembra al inicio y al final del tratamiento experimental.	84
Tabla 15. Aumento de peso corporal de ratas Wistar macho y hembra	85
Tabla 16. Relación de peso órgano/peso corporal de los grupos de ratas Wistar, hembras y machos, empleados en este trabajo (n=6).	91
Tabla 17. Examen General de Orina para ratas Wistar macho control (n=6), (ND: no detectado).....	92
Tabla 18. Examen General de Orina en ratas Wistar macho bajo los cuatro tratamientos determinados a los 60 días (n=6) (ND: no detectado).	93
Tabla 19. Examen General de Orina para ratas Wistar hembra control (n=6). (ND: no detectado)	94
Tabla 20. Examen General de Orina en ratas Wistar hembra para los cuatro grupos a los 60 días (n=6)	95
Tabla 21. Examen general de orina de ratas Wistar macho y hembra de los diferentes grupos experimentales (n=6).....	96

Tabla 22. Ensayo de la Proteína C Reactiva en muestras de suero sanguíneo de ratas Wistar macho y hembra (n=6)	97
Tabla 23. Actividad de Citocromo C-oxidasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra (n=6)....	124
Tabla 24. Especies reactivas de oxígeno en los órganos hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho y hembras bajo los esquemas de exposición y tratamiento	126
Tabla 25. Actividad de enzimas antioxidantes en los órganos hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho y hembras bajo los esquemas de exposición y tratamiento	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de la glucólisis, fases y reacciones enumeradas	7
Figura 2. Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico, fases y reacciones	8
Figura 3. Estructura química de las biomoléculas Glucosa y Fructosa	9
Figura 4. Metabolismo de la fructosa y de la glucosa.....	10
Figura 5. Esquema metabólico de la fructosa.	12
Figura 6. Relación del metabolismo de la sacarosa con el incremento de tejido adiposo subcutáneo y visceral.	14
Figura 7. Factores asociados con el desarrollo de enfermedades metabólicas.....	16
Figura 8. Mecanismos potenciales para la activación del proceso inflamatorio en el tejido adiposo.	18
Figura 9: Fisiopatología de la hiperglucemia.....	21
Figura 10. Contribución del tejido adiposo en la obesidad y las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas.....	23
Figura 11. Papel de las EROs y ERNs en la fisiología de algunas enfermedades	24
Figura 12. Kalanchoe pinnata.....	30
Figura 13. Metabolitos reportados en Kalanchoe pinnata	31
Figura 14: Estructura de los esteroides	36
Figura 15. Extracción Asistida por Ultrasonido	47
Figura 16. Esquema del proceso de obtención de proteínas mediante la técnica de Lowry.....	54
Figura 17. Características físicas de Kalanchoe pinnata en diferentes condiciones de crecimiento.	60
Figura 18. Extractos obtenidos mediante: A) Extracción Rápida con Agua Caliente Presurizada (ERACP) y B) Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU).....	61
Figura 19. Fenómeno de cavitación.....	62
Figura 20. Identificación de flavonoides en muestras por EAU	64
Figura 21. Placas cromatografías del extracto obtenido por EAU.....	65
Figura 22. Presencia de dos fases en el extracto obtenido con un sistema de hexano 100%.	67
Figura 23. Pruebas químicas en los extractos obtenidos con diferentes sistemas de disolventes para la determinación de fitoconstituyentes presentes en Kalanchoe pinnata.....	68
Figura 24. CFF de los extractos obtenidos en la fase orgánica de una extracción hexano 100% y del concentrado de la extracción agua-etanol 1:1.....	70
Figura 25. Poder reductor de un extracto acuoso de las hojas de Kalanchoe pinnata	72

Figura 26. Gráfica correspondiente a la tabla 3 para el porcentaje de la capacidad máxima para captar radicales libres.....	73
Figura 27. Estabilización de DPPH con un agente antioxidante..	74
Figura 28. Curva de calibración del ácido gálico.	75
Figura 29. Barrido de Radicales Superóxido en un extracto metanólico de las hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i> y ácido ascórbico en diferentes concentraciones.....	77
Figura 30. Comparación de <i>Kalanchoe pinnata</i> en el municipio de Texcoco, Estado de México y en Tuxtepec, Oaxaca..	79
Figura 31. Concentración de glucosa en sangre en ratas wistar macho a los tiempos inicial y final.	80
Figura 32. Concentración de glucosa en sangre de los grupos Control y Azúcar de cero a 90 días.	81
Figura 33. Concentración de glucosa en sangre en ratas Wistar hembra a los tiempos inicial y final.....	82
Figura 34. Concentración de glucosa en sangre en ratas Wistar para los grupos de estudio de ambos sexo.	82
Figura 35. Presencia de tejido adiposo en ratas Wistar expuestas a diferentes tratamientos.....	86
Figura 36. Peso de órganos hígado, riñón y páncreas en ratas Wistar macho	87
Figura 37. Peso de órganos hígado, riñón y páncreas en ratas Wistar hembra.....	89
Figura 38. Determinación de EROs en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho bajo los diferentes esquemas de exposición y tratamiento.....	99
Figura 39. Mecanismos de EROs y desbalance redox.....	101
Figura 40. Comparación de la concentración de EROs en los tres órganos de estudio.....	102
Figura 41. Actividad de la enzima Glutación S-transferasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho tratadas con los diferentes esquemas.	104
Figura 42. Comparación de la actividad de la GST en los tres órganos de estudio.	106
Figura 43. Actividad de la enzima Catalasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho tratadas con los diferentes esquemas.	107
Figura 44. Comparación de la actividad de la CAT en los tres órganos de estudio..	108
Figura 45. Actividad de la enzima SOD en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho.....	108
Figura 46. Comparación de la actividad de la SOD en los tres órganos de estudio.....	110
Figura 47. Actividad de Citocromo C-oxidasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho.	111
Figura 48. Especies reactivas de oxígeno en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra, expuestas a los diferentes esquemas de tratamiento.....	115
Figura 49. Comparación de EROs en los tres órganos de estudio..	117

Figura 50. Actividad de la Glutación-S transferasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra, expuestas a los diferentes esquemas de tratamiento.....	117
Figura 51. Comparación de la actividad de la GST en los tres órganos de estudio.	119
Figura 52. Actividad de la enzima catalasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra bajo los diferentes esquemas de tratamiento.....	119
Figura 53. Comparación de la actividad de la CAT en los tres órganos de estudio	120
Figura 54. Actividad de la enzima SOD en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra bajo los diferentes esquemas de tratamiento.....	121
Figura 55. Comparación de la actividad de SOD en los tres órganos de estudio	123
Figura 56. Actividad de Citocromo C-oxidasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra	123

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Bebidas azucaradas

Dentro de la industria de los alimentos, se considera bebida azucarada (BA) a los jugos de fruta que han sido industrializados, los refrescos, las aguas que han sido endulzadas, las bebidas energizantes y sustitutos de azúcar, ya que todas ellas contienen principalmente azúcares añadidos como sacarosa, glucosa y jarabe de maíz alto en fructosa. Este tipo de bebidas contienen exceso de azúcar. Por ejemplo, una bebida azucarada de medio litro tiene 55 g de azúcar, equivalente a 11 cucharadas de azúcar y más de 220 calorías. De acuerdo con la Asociación Americana del Corazón, el ingerir una bebida de este tipo sobrepasa el 100% de la cantidad de azúcar recomendada en niños.¹ En la actualidad, la principal causa de ingesta excesiva de jarabe de maíz alto en azúcares proviene de este tipo de bebidas. Este hecho se ha relacionado, principalmente, con la obesidad.² Este tipo de bebidas constituye un grupo diverso de productos que incluye bebidas carbonatadas o no carbonatadas, energéticas, jugos y néctares de frutas mismos que se pueden clasificar dependiendo de su contenido en azúcar, jugo de fruta, saborizantes, nivel de carbonatación y funcionalidad (Tabla 1).³⁻⁵

Tabla 1. Tipo de bebidas azucaradas (Paredes-Serrano, 2016).

Tipo de bebida	Descripción
Carbonatadas	Endulzadas, bebidas con dióxido de carbono, jarabes para dilución y refrescos.
Jugo	Jugo 100% de fruta o vegetales sin ingredientes, excepto los minerales y vitaminas permitidos, con edulcorantes (menos del 2%).
Néctares	Pulpa y jugos de frutas y vegetales diluidos con edulcorantes, vitaminas y minerales.
Jarabes	Productos concentrados a base de frutas o saborizantes.
Bebidas en polvo	En forma de polvo para diluir.
Té/Café	Bebidas a base de té o café y polvos concentrados para dilución.
Bebidas deportivas	Se pueden describir como isotónica, hipertónica o hipotónica, carbonatada o no, en polvo o concentrados, con sabores frutales o no para diluir.
Bebidas energéticas	Bebidas para aumentar energía, principalmente gasificadas, que contienen taurina, guaraná, glucosa, cafeína, hierbas y sustancias exóticas, vitaminas/minerales.

En países del continente americano, el apogeo del consumo de BA empezó en los años 70's al convertirse en una bebida de la canasta básica y de la vida cotidiana.

En los últimos 20 años el consumo de BA a nivel mundial ha aumentado un promedio de 195 a 275 mL/día en la población general y de 365 a 570 mL/ día en adolescentes.⁶ El consumo de BA comienza con los infantes menores de 24 meses de edad hasta los adolescentes y personas adultas.⁷

De acuerdo con el Estudio Latinoamericano de Nutrición y Salud (ELANS) se observó que en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, México, Perú y Venezuela el consumo promedio de BA preparadas fue de 387.6 g/día.⁸ Del 2012 al 2022, México ocupa el primer lugar a nivel mundial en el uso de BA; esto es preocupante en los infantes ya que, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ESANUT), en el 2018 se estableció que aproximadamente el 85% de los niños de entre 1 y 11 años de edad consumen cada día de 0.81 a 1.04 litros de BA, por otro lado, los adolescentes entre 12 y 19 años ingieren alrededor de 1.4 litros diarios.⁹ En otras palabras, el consumo de BA aumenta conforme los seres humanos van creciendo, a pesar de que actualmente se conoce que el consumo excesivo de BA daña la salud provocando múltiples enfermedades como obesidad, hipertensión, hiperglucemia y diabetes tipo 1 o 2.

ESANUT¹⁰ en 2018, indicó que el sobrepeso en México es debido, principalmente, a la mala alimentación. Por ejemplo, la población de 5 a 11 años no muestra diferencias por sexo (18%), y se incrementa conforme aumenta la edad. Lo anterior se basa en las siguientes cifras, resultado de dicha encuesta.

Hombres		Mujeres	
Edad (años)	Prevalencia de sobrepeso	Edad (años)	Prevalencia de sobrepeso
5 a 11	18%	5 a 11	18%
12 a 19	21%	12 a 19	27%
Más de 20	42%	Más de 20	37%

Datos extraídos de esa encuesta indicaron que la prevalencia de obesidad (siendo esta diferente al sobrepeso) en niños de 5 a 11 años fue del 20%, siendo mayor a un grupo de hombres de 12 a 19 años (15%); sin embargo, en las mujeres se observó una tendencia igual entre ambos grupos (niñas de 5 a 11 años y adolescentes de 12 a 19 años). En las mujeres se comprobó que conforme aumenta la edad, aumentan los problemas de obesidad ya que, mujeres de 20 a 29 años mostraron una prevalencia de obesidad del 26% mientras que en las de 30 a 59 fue del 46%. En los hombres de 20 a 29 años la prevalencia de obesidad fue de 24% mientras que en hombres de 30 a 59 años aumentó a 35%.¹⁰

Debido a que las BA contienen un alto porcentaje de azúcares en forma de monosacáridos y disacáridos, así como derivados de los mismos. A continuación, se muestra el metabolismo de la glucosa y la fructosa y posteriormente sus efectos en el ser humano al ser consumidas junto con otros edulcorantes.

1.2 Metabolismo oxidativo: Degradación de glucosa y fructosa

En las células de cualquier ser vivo existe un cambio continuo de energía y materia con su entorno. La materia que entra a las células es transformada en la energía necesaria para sus actividades vitales. Todo este proceso ocurre mediante procesos químicos catalizados por enzimas constituyendo el metabolismo celular. El metabolismo celular se define como el conjunto de todas las reacciones químicas catalizadas por enzimas que ocurren en la célula.¹¹ El metabolismo se encuentra constituido por dos fases, la cuales se explican a continuación.

- Catabolismo o fase degradativa: En la cual las moléculas orgánicas complejas se fragmentan en moléculas más sencillas, en donde uno de sus productos es la síntesis de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), el cual es útil para muchos procesos metabólicos.
- Anabolismo o fase constructiva: En esta fase ocurre la síntesis de macromoléculas a partir de moléculas sencillas utilizando el ATP obtenido de la fase catabólica.

Existen diferentes biomoléculas productoras de energía: carbohidratos, lípidos y proteínas, mismas que también son formadoras de estructuras en los diferentes seres vivos y que por lo tanto se vuelven esenciales para la vida. Por ello una parte del metabolismo se enfoca solamente en sintetizarlas para la construcción de tejidos y en degradarlas para utilizarlas como recursos energéticos.¹²

En condiciones normales, la principal fuente de energía para cualquier ser vivo son los carbohidratos (CHO), también conocidos como glúcidos, azúcares o hidratos de carbono, los cuales están constituidos por carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O).

1.2.1 Glucosa

La glucosa es la biomolécula más importante. Una vez ingerida, ésta debe ser transportada hacia el interior de las células para poder ser metabolizada. El transporte de glucosa a través de la membrana ocurre por medio de proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) principalmente 1 y 4 las cuales se encuentran en los eritrocitos, placenta, tejido nervioso, tejido muscular y linfocitos. El GLUT-1 es el transportador de glucosa más distribuido en el ser humano, éste se expresa en numerosos tejidos, entre ellos fetal, eritrocitos, células endoteliales y nerviosas, placenta, glóbulos blancos, células de retina, riñón, tejido adiposo, etc., mientras que, el GLUT-4 se expresa fundamentalmente en los tejidos estriado, muscular, cardíaco y en los adipocitos.¹³ El GLUT-1 se codifica por un gen localizado en el cromosoma 22 y está formado por 664 aminoácidos, su mayor expresión ocurre en el músculo esquelético y se presenta durante la gestación pero disminuye después del nacimiento. Cuando hay deficiencia de este transportador se pueden originar convulsiones, retraso en el

crecimiento, microcefalia adquirida, hipotonía y desordenes motores (movimientos involuntarios). Por otra parte, cuando hay alteraciones en el gen que codifica este transportador se puede inducir el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2.^{14,15} GLUT-4 se codifica en el gen 17 y está formado por 509 aminoácidos, presenta alta afinidad por la glucosa y se expresa en los tejidos sensibles a la insulina como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el corazón. La insulina estimula la incorporación de este transportador a la membrana plasmática a través de las vesículas intracelulares incrementando de 10 a 20 veces el transporte de glucosa. Aunque no se conoce con exactitud como la insulina induce la expresión de los GLUTs se sabe que una vez que la insulina se une a su receptor membranar hay un cambio conformacional que estimula la actividad de tirosina-cinasa, esto quiere decir que cuando la glucosa se une a su receptor de membrana se activa una vía de transducción de señales mediada por enzimas, como la tirosina-cinasa. Esta vía tiene como finalidad que el transportador introduzca a la glucosa a la célula.^{15,16}

Como se mencionó anteriormente, los azúcares, principalmente la glucosa, constituyen la principal fuente de energía para los seres humanos. Esto se debe a que la glucosa, al ser catabolizada, produce energía que es fundamental para funciones celulares. A esta secuencia de procesos se conoce como glucólisis. Esta se define como el conjunto de reacciones que ocurren en el citosol de las células eucariotas, comenzando con la glucosa y, dependiendo de la presencia de oxígeno, produciendo diferentes metabolitos. En condiciones aerobias, esta se degrada hasta piruvato, CO₂ y H₂O, mientras que en condiciones anaerobias a ácido láctico (fermentación).^{17,18}

La glucólisis es una de las rutas indispensables para el desarrollo de la vida en mamíferos ya que su ausencia no es compatible con la vida debido a que la glucosa se transforma principalmente a piruvato en presencia de oxígeno teniendo como ganancia neta 2 moléculas de ATP, que es la energía celular.¹⁹

Esta vía metabólica está constituida por 10 pasos:

- 1) La glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (Glu-6-P) por la glucosa cinasa mediante un enlace tipo éster entre un grupo fosfato de una molécula de ATP y un grupo hidroxilo (OH) del carbono 6 de la glucosa. Esta reacción tiene una energía libre de Gibbs (ΔG°) de -16.7 kJ/mol indicando que es una reacción exotérmica.
- 2) La Glu-6-P se isomeriza a fructosa-6-P (Fruct-6-P) mediante la enzima la glucosa-6-fosfato isomerasa. El ΔG° de esta reacción es de 1.7 kJ/mol, siendo una reacción endotérmica.
- 3) La Fruct-6-P, mediante la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK1), se fosforila añadiendo un grupo fosfato proveniente de una molécula de ATP el cual se une con el grupo OH del carbono 1 de la fructosa, para dar como resultado a la Fructosa-1,6-bifosfato. Esta reacción es de tipo exotérmica con ΔG° de -14.2 kJ/mol.

4) La fructosa-1,6-bifosfato se hidroliza por acción de la aldolasa en dos azúcares de 3 carbonos: dihidroxicetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (Gli-3-P). Reacción tipo endotérmica con ΔG° de 23.8 kJ/mol.

5) Cuando se requiere energía, la enzima isomerasa cataliza la conversión de la DHAP a Gli-3-P fácilmente. Para producir, a partir de este punto, dos intermediarios y productos de cada tipo, aumentando la producción de piruvato y ATP. Reacción tipo endotérmica con ΔG° de 7.5 kJ/mol.

6) Las dos moléculas de Gli-3-P se oxidan mediante la enzima Gli-3-P deshidrogenasa para formar glicerato, obteniendo una molécula de nicotinamida adenina dinucleótida (NADH) + H^+ . Al mismo tiempo el fósforo inorgánico (Pi) se une al grupo ácido del carbono 1 de la molécula dando como resultado 1,3-bifosfatoglicerato. El ΔG° de esta reacción es de 6.3 kJ/mol, siendo una reacción tipo endotérmica.

7) El 1,3-bifosfatoglicerato mediante la enzima 3-fosfoglicerato cinasa pierde un grupo fosfato que es aportado al adenosín fosfato (ADP) para poder formar 3-fosfoglicerato y ATP, esto con el fin de producir ATP sin necesidad de O_2 . Este proceso constituye la primera fosforilación a nivel sustrato. Esta reacción es de tipo exotérmica ya que el ΔG° es de -18.5 kJ/mol.

8) La enzima 3-fosfoglicerato mutasa transfiere grupo fosfato del 3-fosfoglicerato al carbono 2 de este mismo, obteniendo 2-fosfoglicerato. Esta reacción es endotérmica con ΔG° es de 4.4 kJ/mol.

9) Mediante la 2-fosfoglicerato DHase el 2-fosfoglicerato se deshidrata y pierde una molécula de agua dando como producto el fosfoenolpiruvato. La ΔG° de esta reacción es de 7.5 kJ/mol, siendo una reacción endotérmica.

10) En este último paso, la piruvato cinasa transfiere un grupo fosfato al ADP para producir ATP, teniendo como producto de esta reacción al piruvato. Se obtienen dos moléculas de piruvato si se cumple con las condiciones mencionadas en el paso 5. Esta reacción es de tipo exotérmica ya que la ΔG° es de 31.4 kJ/mol.^{19,20}

La figura 1 representa los 10 pasos de la glucólisis mencionados anteriormente.

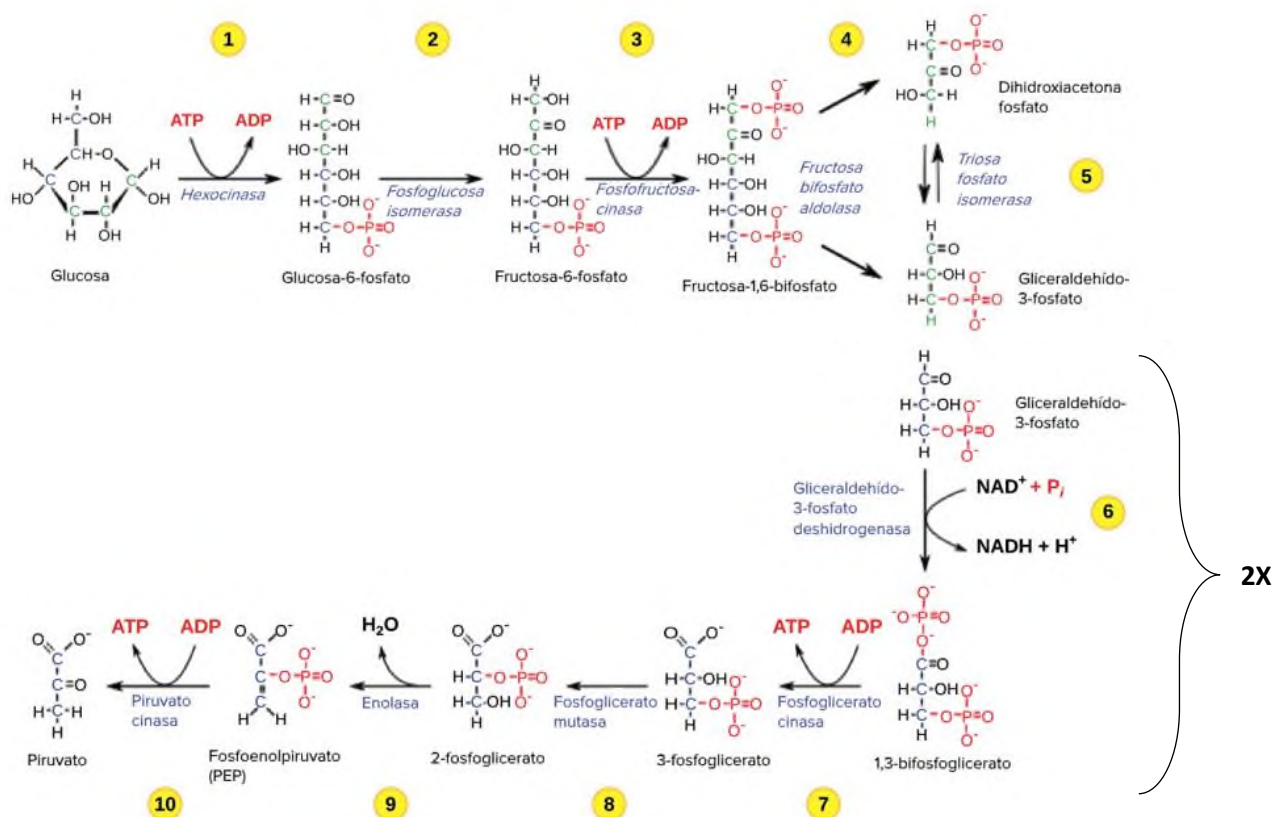


Figura 1. Ruta metabólica de la glucólisis, fases y reacciones enumeradas (Menéndez-Valderrey, 2021).

Cuando la célula requiere energía, la glucólisis produce dos moléculas de piruvato, mismo que, mediante las enzimas del complejo de la Piruvato deshidrogenasa, dentro de la membrana interna de la mitocondria, sintetizan dos moléculas de Acetil Co-A, mismas que participan en el Ciclo de Krebs²¹ (Fig. 2) para producir cuatro moléculas de CO₂, seis NADH y dos moléculas de GTP.

Cuando esto pasa a la cadena de transporte de electrones y se hace el balance de producción de energía, se ha encontrado que por cada mol de glucosa se producen, en total entre 31.5 y 32.5 moles de ATP.²¹

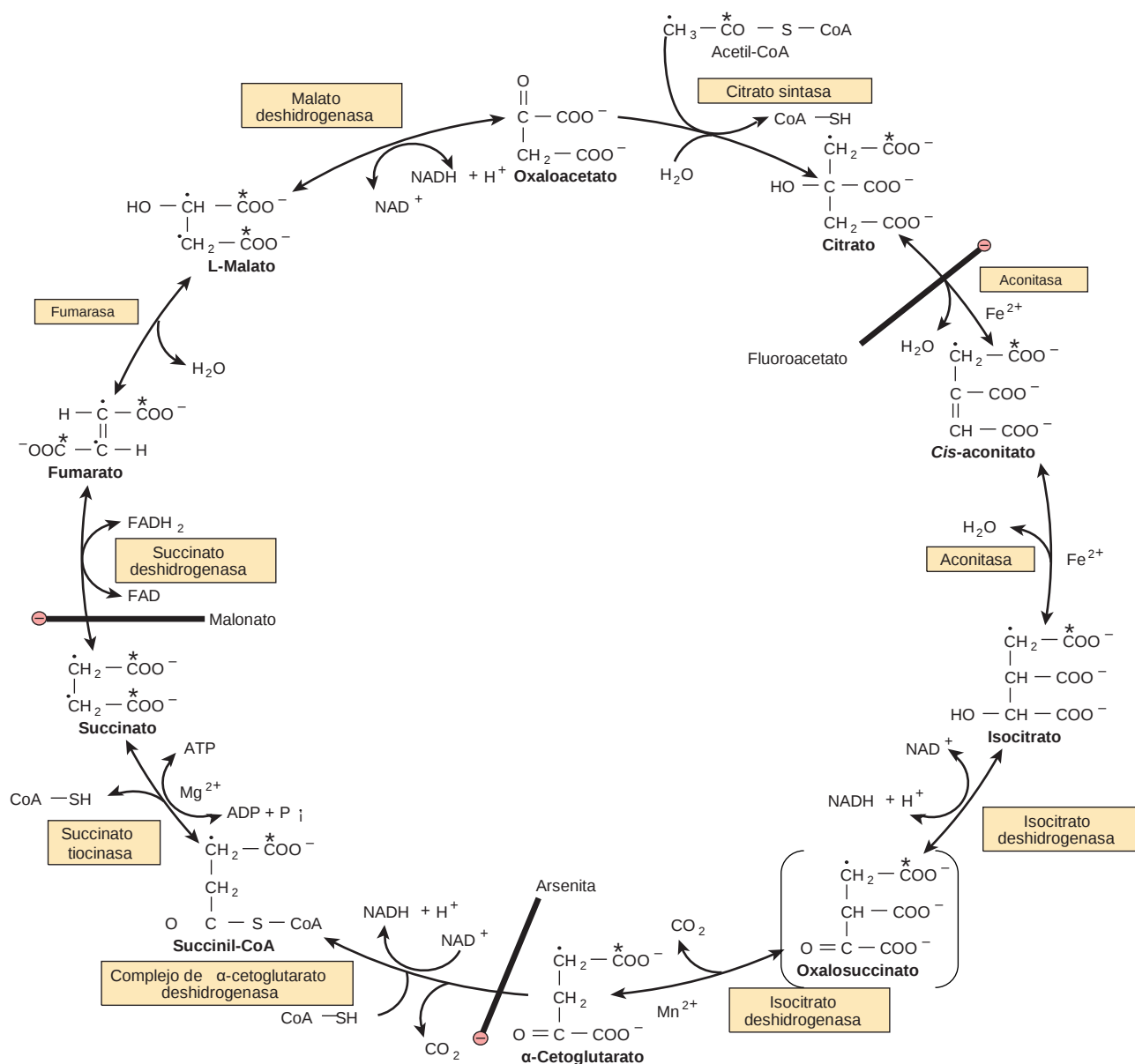


Figura 2. Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico, fases y reacciones (Murray, 2010).

1.2.2 Fructosa

La fructosa constituye otro carbohidrato de importancia biológica que se encuentra en vegetales, frutas y miel. Es isómero de la glucosa, es decir, comparten la misma fórmula molecular ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) pero su estructura es diferente. En la figura 3, se muestran las estructuras de la glucosa y la fructosa, donde se observa que la glucosa posee un grupo aldehído en el primer carbono, mientras que la fructosa posee un grupo cetona en el segundo carbono. Dentro del metabolismo las enzimas reconocen la forma cíclica de estos carbohidratos.

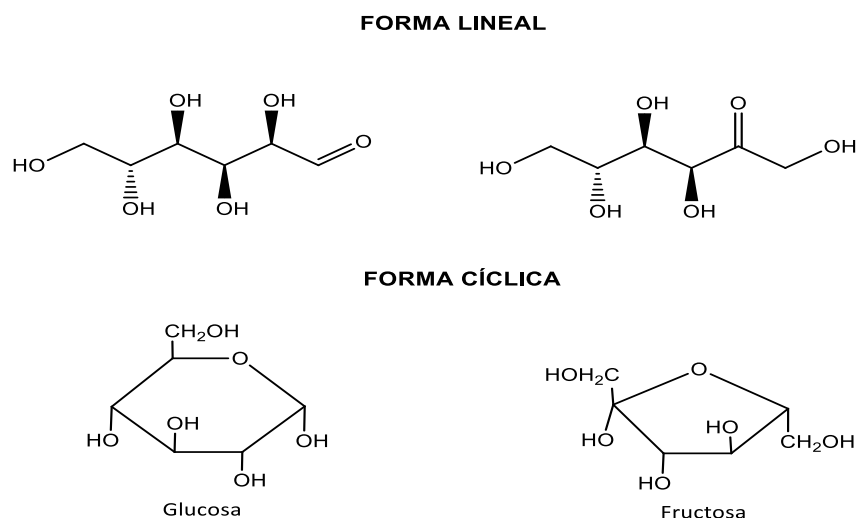


Figura 3. Estructura química de las biomoléculas Glucosa y Fructosa (Gerardo-Agosto, 2023).

El metabolismo de la fructosa comienza cuando la sacarosa es hidrolizada por la enzima sacarosa isomaltasa liberándola junto con la glucosa. Ambos carbohidratos se encuentran unidos mediante un enlace glucosídico, cuando se encuentran en forma de disacárido. La hidrólisis se refiere al rompimiento de ese enlace.

La glucosa entra a la ruta de la glucólisis para la producción de energía, mientras que la fructosa es absorbida en el intestino delgado mediante el transportador GLUT-5 (el cual es específico para la fructosa). Después del transporte apical, la fructosa es transportada en la membrana basolateral por el transportador GLUT-2. Posteriormente desde la circulación llega al hígado donde es captada y metabolizada de manera más rápida que la glucosa, aunque esta última se absorbe más rápido.²² Aunque la fructosa se metaboliza rápido posee un efecto estimulante para la insulina inferior al de la glucosa, ya que el mecanismo por el cual se estimula la liberación de insulina requiere la entrada inicial de glucosa en la célula a través de un transportador que está asociado a la glucocinasa que fosforila la glucosa y constituye el sensor esencial para la liberación de insulina.²³

La figura 4 muestra el metabolismo de la glucosa y fructosa; la glucosa es transportada a tejidos y órganos insulino dependientes y no insulino dependientes mediante los transportadores de membrana GLUT-1, 2 y 4 e ingresa a la ruta de la glucólisis para producir piruvato y ATP mediante la intervención del ciclo de Krebs y de la cadena del transporte de electrones (CTE). Por su parte, la fructosa es metabolizada en el hígado e ingresa a las células por acción de los transportadores GLUT-2, 8 y 9. Cuando las células no requieren energía de más, las triosas continúan la vía metabólica hacia la síntesis de ácidos grasos. El metabolismo de la fructosa no cuenta con puntos de regulación, razón por la cual, la actividad de la fructocinasa se vuelve continua e incrementa las concentraciones de las triosas lo que conlleva al aumento de la síntesis de los ácidos grasos al

igual que el aumento en las concentraciones de ácido úrico como producto del metabolismo de los nucleótidos de adenina.²⁴

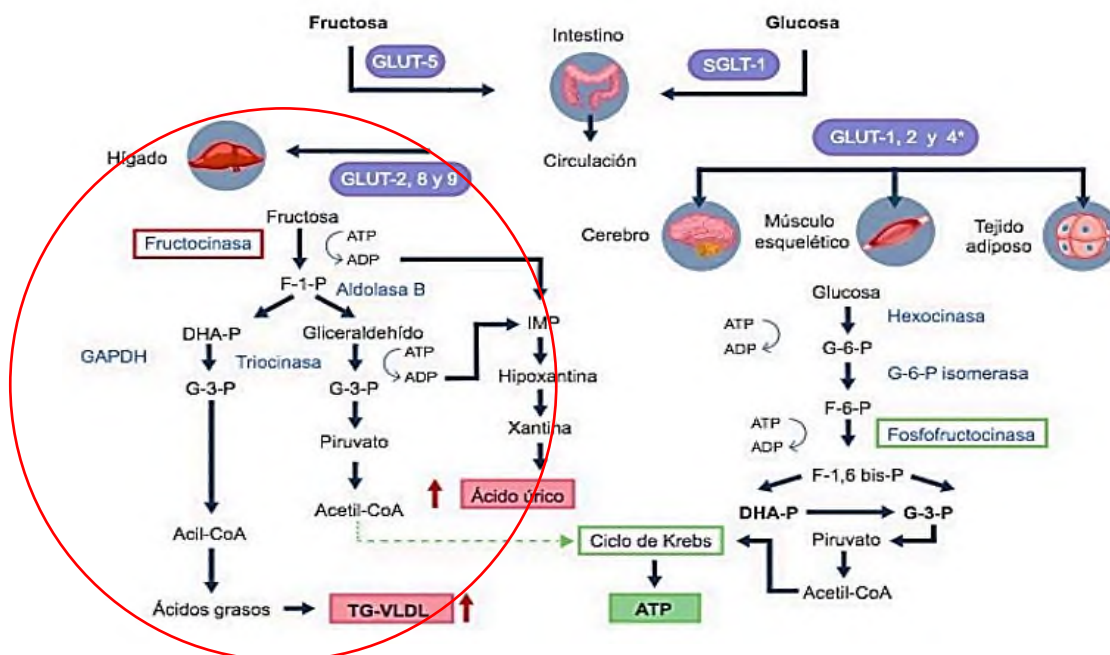


Figura 4. Metabolismo de la fructosa y de la glucosa. (G-3-P: gliceraldehído-3-fosfato; G-6-P: gliceraldehído-6-fosfato; F-1,6bis-P: fructosa-1,6bis-fosfato; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GLUT: transportador de glucosa; DHA-P: dihidroxiacetona fosfato; TG: triacilglicéridos; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; *transportador insulinodependiente (Loza-Medrano, 2019)).

La fructosa se metaboliza principalmente en el hígado. Cuando es absorbida, disminuye rápidamente la concentración del ATP ya que necesita de su grupo fosfato para fosforilarse, dando como producto de esta reacción ADP que puede metabolizarse posteriormente a ácido úrico. La fructosa fosforilada es un sustrato para la aldolasa que produce triosas que sirven como precursores de triacilglicéridos. Esto puede explicar el aumento de la lipogénesis relacionada con el consumo de bebidas altas en fructosa.²⁵

El metabolismo de la fructosa se divide en dos fases:

- 1) La síntesis de triosas: dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (Gli-3-P).
- 2) Conversión de esas triosas en piruvato, el cual es metabolizado para formar acetil Co-A y de esta forma ser incorporado al ciclo de Krebs y condensarse con el oxalacetato mediante la enzima citrato sintasa y formar citrato para, posteriormente, dirigirse hacia la síntesis de ácidos grasos.²⁶

Como el acetil Co-A se sintetiza en el interior de la mitocondria, no puede salir hacia el citosol por lo tanto se condensa con el oxalacetato que se difunde hacia el citosol formando citrato y mediante la citrato liasa romper esta molécula quedando nuevamente acetil Co-A y oxalacetato. En el citosol, el acetil Co-A tiene dos funciones: la primera se basa en el inicio de la síntesis de *ново* (vía metabólica compleja y enormemente regulada, que convierte los carbohidratos en ácidos grasos, que una vez esterificados se almacenan en el tejido adiposo como triacilgliceroles) y la segunda en la base para síntesis de malonil Co-A, que es el donador de unidades carbonadas en la síntesis de ácidos grasos. Esta última molécula es sintetizada a partir de la carboxilación del acetil Co-A mediante la enzima acetil Co-A carboxilasa.²⁷

La figura 5 muestra el metabolismo de la fructosa, donde es transportada por GLU-2 del intestino hasta el hígado para metabolizarse, en condiciones de ingesta normal o también puede ser utilizada en la vía de lipogénesis, cuando es consumida en exceso ya que estimula la proteína de unión al receptor del esterol-1 que activa los genes involucrados en la lipogénesis.²⁸

En el hígado la fructosa genera triosas-fosfatos que se pueden unir a la vía de la glucólisis. Estos productos a su vez, pueden ser secretados en la circulación o proporcionar glucógeno hepático y triacilgliceroles.²⁹ Lo anterior puede provocar, como resultado, una disminución en la secreción de insulina y un aumento de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triacilgliceroles (TAG), de igual forma, puede aumentar los depósitos de grasa visceral e intrahepática, ocasionando hipertrigliceridemia (exceso de TAG en la sangre) e hipertensión.³⁰⁻³² Por otro lado, a nivel gastrointestinal, la ingesta elevada de fructosa, podría ocasionar síntomas asociados a una mala absorción de fructosa, como distensión abdominal, meteorismo (exceso de gases) y diarrea. Existe una relación directa entre la aparición de sintomatología gastrointestinal y el aumento en la ingesta de fructosa. Las consecuencias fisiológicas de la mala absorción de fructosa, incluyen un aumento de la carga osmótica luminal; que el monosacárido se convierta en sustrato de rápida fermentación para bacterias en el colon; alteración de la motilidad gastrointestinal y generación de un cambio en la flora intestinal. Por otra parte, el consumo de bebidas gaseosas con hidrofluorocarburos, ha demostrado estar asociado al desarrollo de resistencia a la insulina, hígado graso no alcohólico, diabetes mellitus, obesidad y enfermedades cardiovasculares.³³

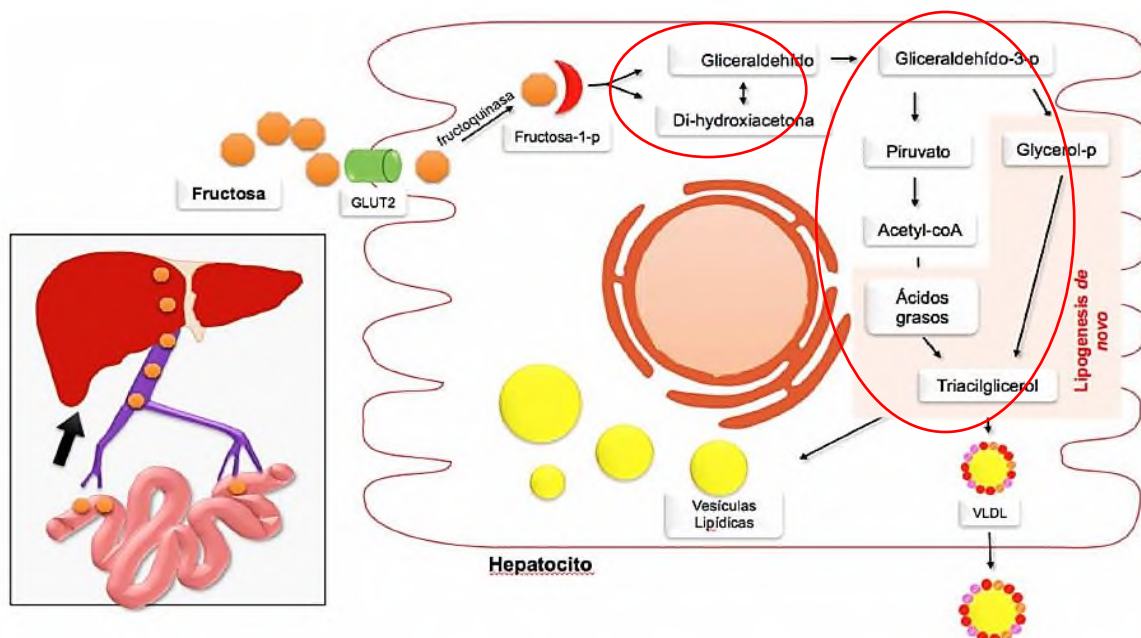


Figura 5. Esquema metabólico de la fructosa. Metabolismo de la fructosa transportada por GLUT2 del intestino hasta el hígado, donde se metaboliza, en condiciones de ingesta normal, o puede ser utilizada en la vía de la lipogénesis de *novo*, cuando es ingerida en exceso (VLDL: Lipoproteínas de baja densidad, GLUT2: Transportador de glucosa 2). Imagen tomada de Efectos Metabólicos del Consumo Excesivo de Fructosa Añadida (Carvallo, *et. al.* 2019).

1.3 Composición de las bebidas azucaradas

Las Bebidas Azucaradas comerciales contienen agua, saborizantes artificiales, ácidos como el fosfórico, cítrico, málico, tartárico, cafeína, colorantes, edulcorantes, CO₂, conservadores y azúcares refinados, especialmente jarabe de maíz que es alto en fructosa (JMAF),³⁷ el cual es elaborado a partir del almidón de maíz que es hidrolizado por al α -amilasa para obtener moléculas de glucosa libre que posteriormente se convierten en fructosa mediante la glucosa isomerasa. Este jarabe de maíz se puede clasificar de acuerdo con la fructosa en la mezcla (42%, 55% o 100%).³⁴ Es importante recalcar que, aunque las frutas y sus zumos contienen fructosa son menos propensas a inducir alteraciones en el metabolismo ya que su contenido de fructosa es menor comparado con una BA, además de que las frutas contienen vitamina C, flavonoides, epicatequina y otros antioxidantes que regulan los efectos generados por el consumo de BA, de esta manera se explica porque el consumo de frutas naturales no está relacionado con el desarrollo de enfermedades hepáticas y desórdenes en el metabolismo, pero las BA sí están relacionadas con este tipo de afecciones ya que contienen una alta concentración de fructosa que son adsorbidas rápidamente.³⁵

Alcántara-Ortiz *et. al.* reportaron mediante una revisión sistemática evaluada en el 2021, la cantidad de fructosa que contienen los alimentos y bebidas procesadas consideradas “snacks” o comida chatarra por

porción, la tabla 2 muestra el JMAF de los alimentos procesados más populares en la población mexicana, en personas con un rango de edad de 5 a 20 años.³⁶

Tabla 2. Alimentos procesados principales que contienen fructosa

Producto	Porción	Contenido de JMAF/Fructosa
Coca-Cola	100 mL	12 g
Naranjada Jumex Frutzzo	100 mL	8.5 g
Levité Piña-coco de Bonafont	100 mL	4.75 g
Choco-roles Marinela	100 g	40 g
Galletas emperador de Gamesa	100 g	33.3 g
Galletas Break Fast biscuits de Quaker	100 g	28.3 g
Doraditas Tía Rosa	100 g	24.54 g

Se sabe que la fructosa promueve la adiposidad a través de la síntesis de triacilglicerol. Cuando llega al hígado es fosforilada a fructosa-1-fosfato por la fructosa cinasa para luego sintetizar glicerol-3-fosfato (molécula base para la síntesis de triacilglicerol). Por lo tanto, cuando es consumida en altas cantidades se produce un incremento de triacilglicerol originando, así, aumento de tejido adiposo y acumulación ectópica de lípidos en el músculo esquelético o en el hígado (lipotoxicidad: fenómeno que desencadenan los ácidos grasos y sus metabolitos, o la acumulación de éstos) lo que constituye la unión entre este fenómeno y la insulinoresistencia. La fructosa también puede aumentar el nivel de ácido úrico en el suero, lo que puede reducir la concentración de óxido nítrico endotelial e incrementar la presión arterial ya que al reducir la producción de óxido nítrico se dificulta la dilatación de los vasos sanguíneos.³⁷

En los últimos 50 años, la ingesta de fructosa (principalmente en combinación con glucosa) ha aumentado drásticamente a nivel mundial,³⁸ lo que ha llevado a estudios previos en animales y humanos, obteniendo como resultado la relación entre el aumento de la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico.³⁹

La fructosa presenta un metabolismo diferente al de la glucosa. La primera puede disminuir la actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) al producir una menor respuesta a la insulina postprandial y sensibilidad a la insulina manteniendo los niveles elevados de triglicéridos. Varios estudios han demostrado que el tejido adiposo subcutáneo es más sensible a los efectos de la insulina sobre la activación de la LPL.³⁶ Lo anterior, indica que las diferentes respuestas de la enzima lipoproteína lipasa pueden contribuir al aumento de tejido adiposo subcutáneo en personas consumidoras de glucosa y de igual forma, al aumento del tejido adiposo visceral en quienes consumen fructosa.

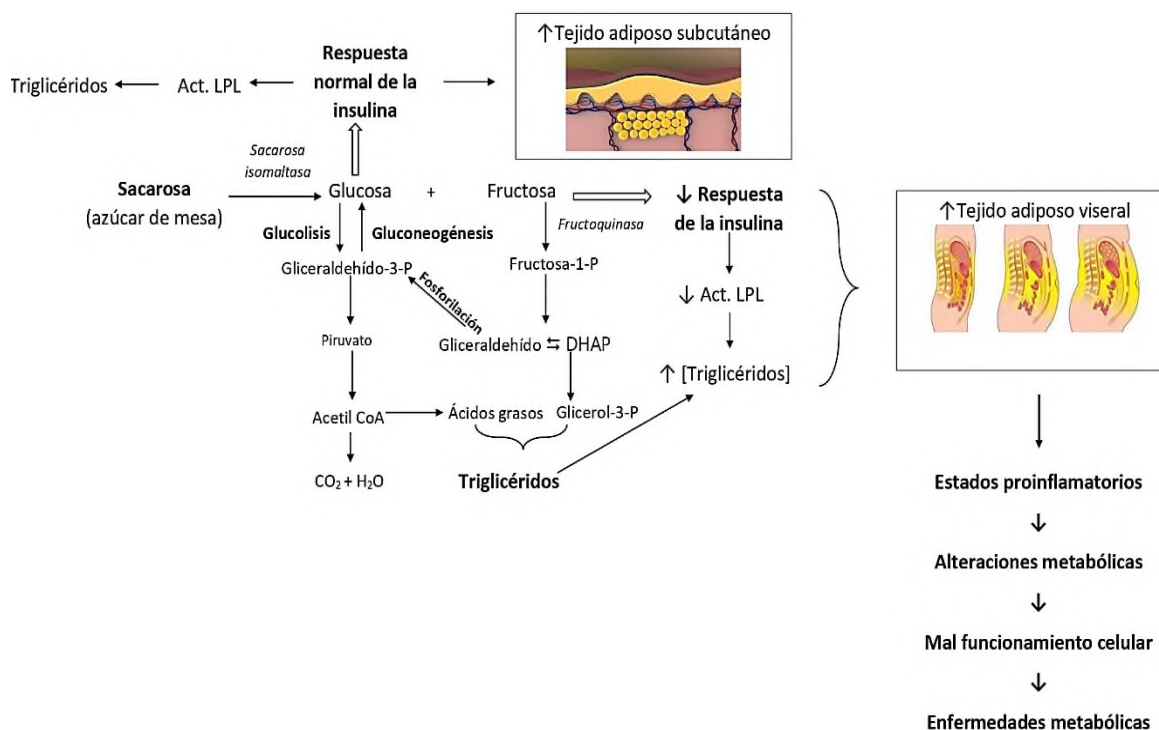


Figura 6. Relación del metabolismo de la sacarosa con el incremento de tejido adiposo subcutáneo y visceral. (Gerardo-Agosto, 2022; <https://bit.ly/3PcL7Ji>; <https://bit.ly/3PB4Ink>).

Se puede afirmar que el consumo excesivo de fructosa puede promover el desarrollo de enfermedades metabólicas mediante un aumento de la adiposidad y la resistencia a la insulina ocasionando el aumento de la concentración de ácidos grasos en la circulación (Fig.6).

El consumo de BA se ha relacionado con el incremento de diferentes enfermedades metabólicas, como obesidad, alteraciones en el perfil lipídico y de la presión arterial. En algunos casos, el consumo de este tipo de bebidas se ha asociado con el deterioro de la salud mental relacionándose a enfermedades como Parkinson y Alzheimer y un mayor riesgo a desarrollar trastornos del estado de ánimo como la ansiedad, la depresión y la bipolaridad.⁴⁰

1.4 Enfermedades metabólicas

Las enfermedades metabólicas son un conjunto de enfermedades causadas por mutaciones genéticas que tiene como consecuencias alteraciones en el funcionamiento de enzimas, proteínas o transportadores, lo cual conlleva a una alteración en el funcionamiento de las células. Esta alteración puede producir sustratos enzimáticos no catalizados, déficit de producción de proteínas fundamentales e incluso inhibir la producción de energía celular o la pérdida de funcionamiento de algún receptor celular o transportador. Este tipo de enfermedades constituyen una serie de desórdenes o anomalías que se producen dentro del

metabolismo, que en conjunto son consideradas como factores principales o condicionantes del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hepáticas y renales.⁴¹

La ingesta de fructosa se puede relacionar con diferentes enfermedades, por ejemplo, en altas cantidades se relaciona con el aumento de peso corporal e incremento de tejido adiposo abdominal y visceral debido al aumento de lipogénesis, ya que la fructosa disminuye las concentraciones circulares de insulina y genera resistencia a la leptina, lo cual genera una menor sensación de saciedad provocando mayor ingesta de alimentos (CHOS, calorías, etc.) aumentando la síntesis de ácidos grasos. Otra consecuencia de la ingesta de fructosa es la resistencia a la insulina ya que se encuentra directamente relacionada con el metabolismo de los lípidos, secundaria a la producción de metabolitos como la acetil-CoA, las ceramidas y el diacilglicerol. Tappy *et. al.* determinaron que cada 50 g de fructosa ingerida se convierte en 3% en grasa en el hígado, en forma de triglicéridos, el 50% en glucosa, el 25% en lactato y el 15% en glucógeno,⁴² explicando, de esta forma; la relación que existe entre la fructosa y el hígado graso. Esta enfermedad puede evolucionar desde una forma leve (esteatosis hepática) hasta una más agresiva (esteatohepatitis) teniendo como consecuencias cirrosis y falla hepática. Es decir, un alto consumo de fructosa aumentará la concentración de triglicéridos presentes en el plasma estimulando la síntesis de *ново*, así como la oxidación defectuosa de ácidos grasos a nivel hepático, generando acumulación de lípidos en este órgano.⁴³ Los criterios propuestos para considerar una enfermedad como metabólica son diversos, sin embargo, varios autores han reportado datos respecto al diagnóstico, prevención y tratamiento de éstas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Federación Internacional de Diabetes (IDF), el Programa Nacional de Educación sobre el Panel de Colesterol de Tratamiento para Adultos III (ATP III) y la Asociación Estadounidense de Endocrinólogos Clínicos (AACE) han propuesto los siguientes criterios o componentes a considerar en una enfermedad metabólica (tabla 3).⁴⁴

Tabla 3. Componentes de enfermedades metabólicas según la ATP III, OMS, AACE e IDF.

Componentes	ATP III	OMS	AACE	IDF
Triglicéridos $\geq$ 150 mg/dl	X	X	X	X
Colesterol < 40 mg/dL en varones y 50 mg/dL en mujeres	X	X	X	X
Presión arterial > 130/85 mmHg	X	X	X	
Insulino resistencia		X		
Glucosa en ayunas > 100 mg/dL	X		X	X
Glucosa 2h: 140 mg/dl			X	
Obesidad abdominal	X			X
Índice de masa corporal elevado		X	X	

La base de estas enfermedades es la resistencia a la insulina. La insulino resistencia (IR) se puede definir como el estado metabólico en el cual los efectos tisulares de la insulina se encuentran alterados generando disminución de procesos como la homeostasis de macromoléculas, diferenciación celular, regulación de la presión arterial, etc.⁴⁵ La IR se observa en personas que padecen obesidad, síndrome de ovario poliquístico, infección crónica y enfermedades relacionadas con alteraciones metabólicas. Estudios clínicos han demostrado que la obesidad se relaciona con un flujo elevado de ácidos grasos libres (AGL) lo cual se asocia con la inhibición de lipogénesis en el tejido adiposo dependiente de la insulina, por ello los AGL contribuyen tanto a la progresión de la IR como a la hiperinsulinemia (insulina en la sangre > 5-25 (U/mL)) lo cual se produce por varios mecanismos como disminución de la captación y utilización de glucosa, inhibición en el ciclo de Krebs y alteración en el patrón de la secreción de insulina.⁴⁶ Dado que existe una relación entre la obesidad y la IR (Fig. 7) se ha planteado que también la obesidad es un factor importante de riesgo de padecer enfermedades metabólicas ya que implica el aumento y acumulación de tejido adiposo, generando adipocinas que favorecen estados proinflamatorios y protombóticos.

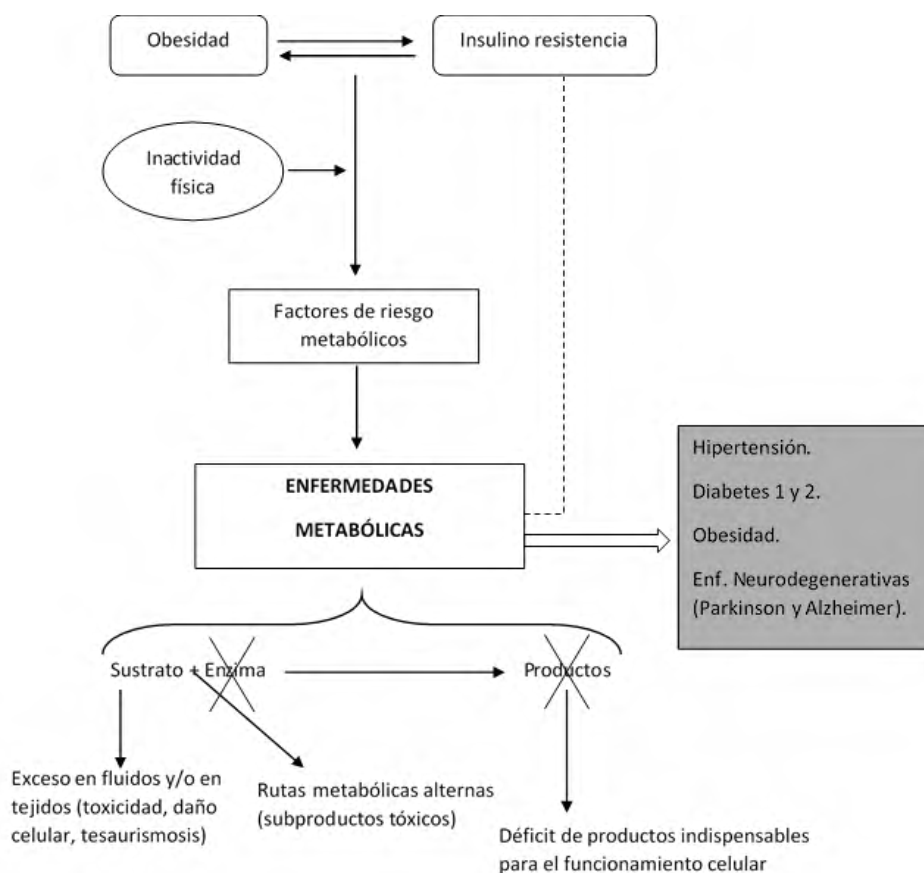


Figura 7. Factores asociados con el desarrollo de enfermedades metabólicas. (Lizarzaburu-Robles, 2013, modificada por Gerardo-Agosto, 2022).

De acuerdo con los datos de la OMS, este tipo de patologías son responsables del 70% de todas las enfermedades anuales del mundo. Se ha calculado que, de 41 millones de personas, aproximadamente 15 millones de fallecidos oscilaban entre los 15 y 69 años. Entre los principales factores de riesgo que condicionan el desarrollo de este tipo de enfermedades se encuentra el tabaquismo, la inactividad física, el consumo nocivo de alcohol, la mala alimentación y la presencia de xenobióticos en los ecosistemas ambientales.⁴⁷

1.5 Obesidad

La definición de obesidad es arbitraria, pero todas llegan al mismo significado: exceso o acumulación excesiva de tejido adiposo en zona visceral y en tejido muscular. Se ha confirmado que los riesgos para la salud son significativos, cuando el sobrepeso alcanza el 20 o el 25 % del índice de masa corporal, IMC, el cual es un indicador confiable de sobrepeso y obesidad y se usa para identificar las categorías de peso que pueden llevar a problemas de salud. Se calcula con el peso de la persona en kilogramos dividido por la estatura en metros cuadrados.^{48,49}

La obesidad es una enfermedad metabólica relacionada con el metabolismo de los lípidos, que se caracteriza por un exceso de grasa corporal, de elevada prevalencia y de demanda asistencial creciente que condiciona la salud de la persona que la padece. Cuando la cantidad de energía que se ingiere con los alimentos (carbohidratos, lípidos, proteínas) es superior a la que se gasta, el exceso de ésta es depositado en el tejido adiposo promoviendo la síntesis de lípidos. Además, se encuentra asociada al desarrollo de múltiples desórdenes alimenticios y metabólicos. Se relaciona con el funcionamiento del tejido adiposo el cual aparte de ser una forma de almacenamiento de energía también sirve para regular el metabolismo. Es decir, el tejido adiposo maneja los depósitos de ácidos grasos no esterificados (triacilglicerolos libres) en el cuerpo, los cuales llegan a través de la circulación sanguínea y son captados y transportados al interior de los adipocitos por diferentes receptores o por difusión pasiva. Una vez dentro de los adipocitos, los lípidos son esterificados por la enzima acil Co-A sintasa y usados para la síntesis de triglicéridos (TAG) en el retículo endoplásmico rugoso. En el caso de las personas obesas, el tejido adiposo es abundante y por ende promueve un estado pro inflamatorio generalizado, con un incremento en el número y migración de los macrófagos hacia el tejido adiposo. Este cambio está asociado con la inflamación sistemática y la resistencia a la insulina (Fig. 8).^{50,51}

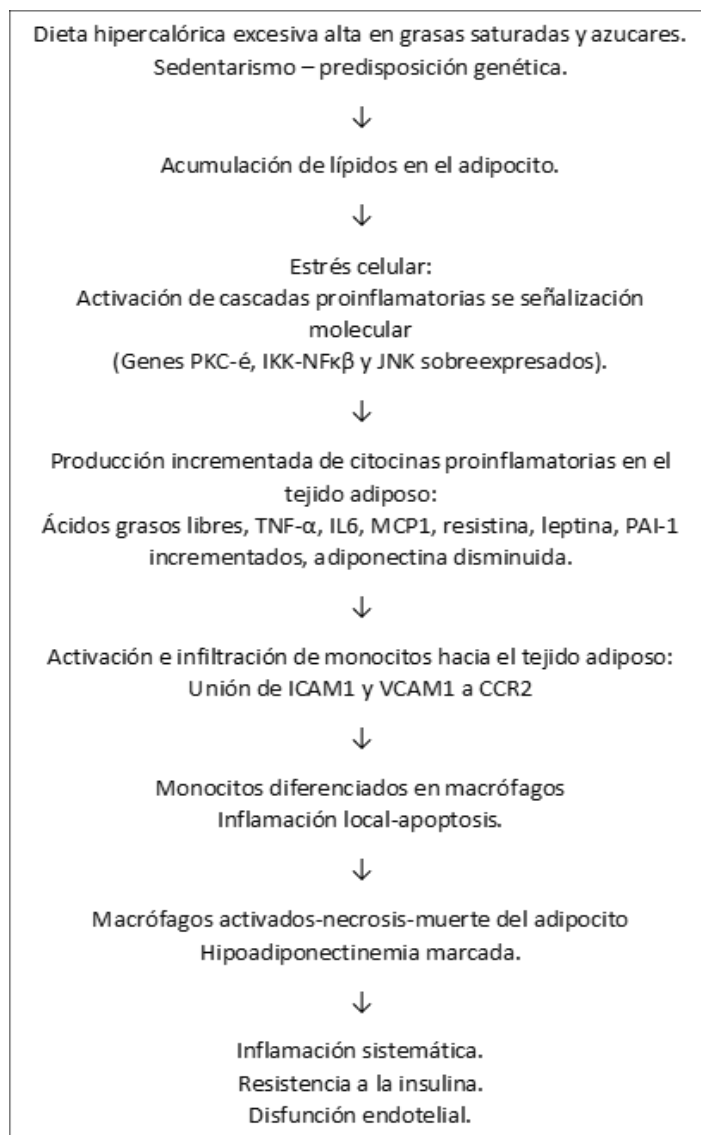


Figura 8. Mecanismos potenciales para la activación del proceso inflamatorio en el tejido adiposo, (Bastarrachea, 2007).

Como ya se ha mencionado, la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y calorías gastadas. Lo anterior se debe, entre otras cosas, a que actualmente la población en general ha optado por tener una mayor ingesta de alimentos ricos en lípidos, sal y azúcares, pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes. Por ejemplo, el consumo de *Soritol* que es un derivado de la glucosa presente en productos dietéticos que, aunque no presenta aumentos repentinos en el nivel de glucosa en sangre puede presentar efectos laxantes. Otro sustituto de azúcar es la *Sacarina* conocida como sal sódica, aunque se encuentra en bebidas gaseosas y productos de panadería, existe la sospecha que genera posibles sustancias carcinogénicas, motivo por el cual EE. UU y Canadá decidieron prohibir su uso. Por

último, está el Ciclamato el cual endulza de 30 a 50 veces más que la sacarosa, sin embargo, este compuesto se encuentra en estudios ya que el producto resultante de su metabolismo es la ciclohexilamina y esta puede producir daños genéticos y posible atrofia testicular.⁵²

Como consecuencia de la obesidad se pueden desarrollar enfermedades cardiovasculares, aumento de glucosa en la sangre (hiperglucemia), trastornos en el aparato locomotor y algunos cánceres (endometrio, mama y colon). Los infantes tienden a presentar una mayor probabilidad de obesidad y esto conlleva a una muerte prematura o a la presencia de discapacidades físicas al momento de llegar a la etapa adulta, además de presentar dificultad para respirar, mayor riesgo de fracturas, hipertensión, resistencia a la insulina y a su vez, la hiperglucemia.⁵³

1.6 Hiperglucemia

La hiperglucemia se define como cualquier valor de glucosa en sangre mayor a los valores de 100 a 125 mg/dL en ayuno (6 a 8 horas antes de la toma),⁵⁴ además, es la manifestación de una enfermedad crónica resultado de un cambio metabólico y hormonal agudo, asociado con una respuesta a lesión mitocondrial y estrés celular.⁵⁵ La hiperglucemia se caracteriza por ser una afección potencialmente tóxica en personas con diabetes mellitus previa ya que es capaz de inducir un estado proinflamatorio lo que contribuye a la sobrecarga celular de glucosa y el estrés oxidativo celular.⁵⁶ Es decir, se puede asociar con un incremento en la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs). El incremento en la carga oxidativa en la hiperglucemia se asocia con el daño a los lípidos, proteínas y DNA.⁵⁷ La hiperglucemia afecta la inmunidad celular y puede provocar la reducción de la activación de neutrófilos, disminución del quimotactismo, disminución de la fagocitosis y la actividad bactericida intracelular.¹⁸ Algunos síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria (excreción abundante de orina), polidipsia (sed excesiva), pérdida de peso, a veces con polifagia (exceso de apetito) y visión borrosa, además del incremento en la susceptibilidad a infecciones ocasionando, como consecuencia, enfermedades mortales como diabetes, hiperglucemia con cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no cetósico.⁵⁸ La liberación de hormonas contrarreguladoras (catecolaminas, cortisol, hormona del crecimiento y glucagón) producen alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos; resistencia a la insulina; incremento en la producción hepática de glucosa y deficiencia relativa de la insulina.^{59,60}

La hiperglucemia puede estar relacionada con variables fisiológicas en los seres vivos como la edad, el genotipo, el género, etc. La hiperglucemia, al ser un desequilibrio metabólico se ve afectado por la obesidad

y la mala alimentación. Si esto no se trata a tiempo y de la manera adecuada puede desencadenar enfermedades metabólicas más complejas y graves, como la diabetes.⁶¹

El ayuno y la dieta establecida en la rutina diaria constituyen factores que afectan la presencia de glucosa en la sangre ya que esta se encuentra regulada por el aporte y los tipos de carbohidratos en la dieta. El ayuno es uno de los factores principales que pueden modificar la concentración de glucosa presente en la sangre, pero esta se puede elevar 10 minutos después de la primera ingesta de alimentos ya que es el resultado de la absorción de nutrientes.

La diabetes reduce drásticamente los efectos de la insulina en el cuerpo. Esto se debe a que el páncreas no puede producir insulina (diabetes tipo 1), o también a que el cuerpo genera una resistencia a los efectos de la insulina o no produce suficiente insulina para mantener un nivel de glucosa normal (diabetes tipo 2). Como resultado, la glucosa tiende a acumularse en el torrente sanguíneo (hiperglicemia) y puede alcanzar niveles muy elevados, lo cual representa un peligro si no se trata en forma adecuada.⁶²

Diversos factores están involucrados en el desarrollo de la hiperglucemia como lo son: la mala alimentación, el consumo excesivo de bebidas azucaradas, gaseosas y alcohólicas, el sedentarismo, la obesidad y el consumo de tabaco. Los mecanismos de este trastorno varían dependiendo de la tolerancia a la glucosa y la capacidad de producción de insulina por parte del ser vivo, así como el tipo, gravedad y estado de la enfermedad presente, además de los fármacos empleados para su tratamiento, es decir, la deficiencia absoluta o relativa de insulina y el incremento de hormonas contrarreguladoras ocasionan afecciones en los órganos y músculos dependientes de glucosa, como lo es el hígado (órgano que mantiene los niveles de azúcar en la sangre circulante), los músculos (cuya dependencia varía desde la formación de proteínas hasta la obtención de energía celular) y el tejido adiposo (forma de reserva energética obtenida por la ruta catabólica de la fructosa y síntesis de TAG). Esto conlleva a que haya un incremento en la concentración de glucosa teniendo como resultados efectos tisulares como la reducción de óxido nítrico, generación de superóxido, lesiones mitocondriales, entre otros. Además de efectos circulatorios y electrolíticos como lo es la hipoperfusión (disminución de flujo en la sangre en los órganos), pérdida de electrolitos, entre otras, todo esto conllevando a múltiples fallas orgánicas e incluso a la muerte (Fig. 9).⁵⁷

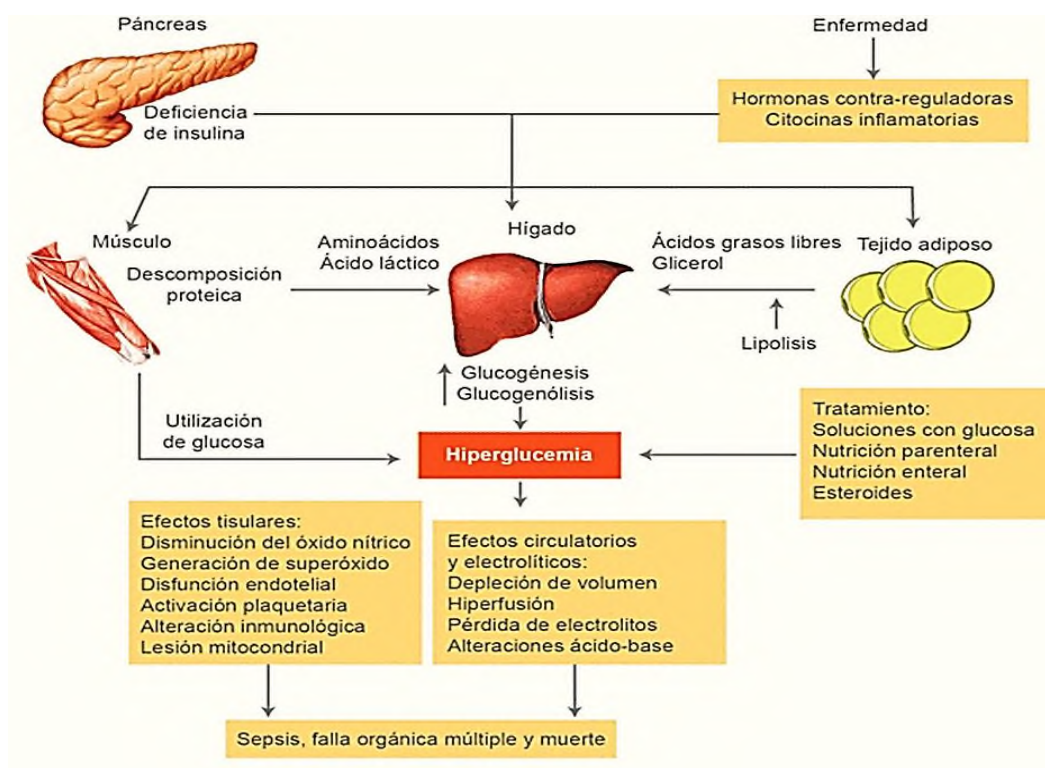


Figura 9: Fisiopatología de la hiperglucemia (García-Ramos, 2014).

1.7 Inflamación y Estrés oxidativo

La inflamación es un proceso complejo que implica una serie de reacciones interdependientes. En relación con ello, Khovidhunkid *et. al.*, comprobaron que la interacción entre el metabolismo y el sistema inmune implica procesos altamente regulados, lo cual indica que el desequilibrio metabólico puede provocar un desequilibrio inmune, teniendo como características desnutrición e inmunosupresión de un lado y obesidad e inflamación del otro.⁶³ Una respuesta de inflamación regular implica el funcionamiento de ciertas vías metabólicas, principalmente de los lípidos, así como de la producción y redistribución de energía, todo esto para favorecer el estado catabólico y a su vez suprimir reacciones anabólicas como puede ser el caso de la síntesis de insulina, ya que al ocupar los canales de distribución de energía genera una disminución de la relación ATP/ADP lo que causa una hiperpolarización de la membrana plasmática por la salida de los cationes potasio, cerrando los canales de calcio dependientes del voltaje y a su vez, suprimiendo la secreción de insulina.⁶⁴

Varios factores exógenos y/o endógenos pueden alterar los procesos bioquímicos que ocurren en el cuerpo de un ser vivo involucrando, a su vez, al sistema inmune al afectar su estabilidad generando estrés

inflamatorio. Una de las principales funciones del sistema inmune es reconocer y eliminar patógenos externos e internos mediante los siguientes procesos:⁶⁵

- 1) La inmunidad innata o inespecífica: Consiste en barreras que impiden que los agentes patógenos ingresen al cuerpo.
- 2) La inmunidad adquirida: El sistema inmune aprende de ésta cuando el ser vivo se expone a agentes patógenos, de tal forma que cuando los linfocitos empiezan a atacar desarrollan al mismo tiempo una memoria respecto a este antígeno.⁶⁶

En relación con el proceso inflamatorio se ha observado la participación de varias proteínas y moléculas regulatorias. La primera de ellas es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que es una citocina inflamatoria que se produce en los macrófagos y en otras células. La siguiente es la interleucina-1 (IL1) que junto con TNF α desarrollan una serie de reacciones en las cuales sus efectos caen sobre el endotelio, leucocitos y fibroblastos induciendo respuestas inflamatorias sistemáticas⁶⁷. Cuando una persona tiene exceso de tejido adiposo suele aumentar la presencia de mediadores de inflamación, entre ellos la interleucina-6 (la cual tiene un efecto en la resistencia a la insulina), el TNF α y la Proteína-C Reactiva (PCR, proteína que aumenta en respuesta a la inflamación).

Aunque en la actualidad no se conoce con exactitud como empieza la respuesta inflamatoria, se puede decir que probablemente inicia con los mismos adipocitos ya que ellos son los primeros afectados después de un desorden metabólico. Diversos autores, como Almudena *et. al.*, Özcan *et. al.*, y Nakatani *et. al.*, han relacionado la activación de las vías inflamatorias con la obesidad. Lo anterior se relaciona con una acumulación de lípidos en los adipocitos, lo cual da inicio al estrés celular y a la activación de las vías JNK (Jun N-Terminal Kinase, que es el eslabón final de las vías de transducción de señales en respuesta de citocinas y estrés celular), y del factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B). Estas vías regulan la fosforilación de proteínas y generan reacciones celulares de transcripción que dan lugar a un aumento de moléculas proinflamatorias en el adipocito, incluidas TNF α , IL-6, leptina y resistina, también hay un aumento de quimiocinas como la proteína quimioattractante de monocitos (MCP-1) y de otros mediadores proaterogénicos. Las moléculas quimioattractantes junto con las moléculas de adhesión se unen a integrinas y receptores de quimiocinas para favorecer la recepción de monocitos y otras células inflamatorias del tejido adiposo. Los adipocitos amplifican la respuesta inflamatoria, quienes una vez que están en el interior se diferencian de los macrófagos, produciendo quimiocinas inflamatorias.⁶⁸⁻⁷⁰

Otro mecanismo que desencadena el proceso inflamatorio es el estrés oxidativo. En este caso, bajo condiciones de hiperglucemia, aumenta la recepción de glucosa en las células endoteliales del tejido adiposo

causando un exceso de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs o ROS, por sus siglas en inglés) y posteriormente activando señales de inflamación dentro de la célula endotelial. El daño ocasionado en estas células genera quimiotaxis de macrófagos aumentando aún más la inflamación local. Es decir, la hiperglucemia estimula la generación de EROs en los adipocitos lo cual incrementa la presencia de citocinas proinflamatorias.^{71,72}

En la figura 10 se observa la contribución del tejido adiposo en la obesidad lo cual produce una acumulación de lípidos dando inicio al estrés celular y a la activación de las vías JNK y de NF- κ B, generando inflamación local en el adipocito por el incremento de células endoteliales. Esto provoca resistencia hepática a la insulina y la inflamación local en el hígado debido a la alta concentración de lípidos, mayor estimulación de las vías JNK y NF- κ B. Todo lo anterior da lugar a la resistencia a la insulina periférica en los músculos y riñones, alteraciones metabólicas como aumento en la concentración de glucosa y triglicéridos y afecciones en el tejido vascular como hipertensión y aterosclerosis.

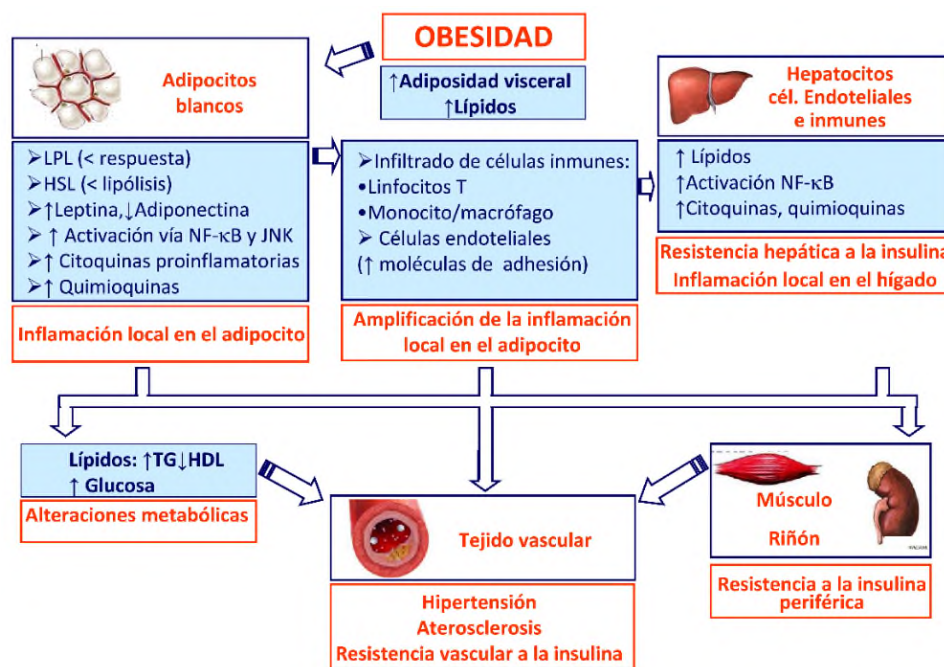


Figura 10. Contribución del tejido adiposo en la obesidad y las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. (Almudena-Hernández, 2014).

El oxígeno es necesario y esencial para la mayoría de seres vivos, ya que actúa en la respiración mitocondrial como aceptor final de 4 electrones, generando dos moléculas de agua y la formación de ATP.⁷³ Los organismos vivos que se desarrollan en condiciones aerobias están expuestos a diversos agentes oxidantes los cuales pueden ser de dos tipos: las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERNs).⁷⁴ Ambos tipos tienen funciones biológicas para el desarrollo celular normal, pero cuando existe un aumento

de concentración estos oxidantes pueden resultar en una homeostasis deteriorada y conducir diversas patologías, como algunas enfermedades neurodegenerativas como el cáncer, la diabetes tipo 2, entre otras.^{75,76}

El término EROs se refiere a un grupo de moléculas que contienen oxígeno con diferente actividad química, se les considera metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos que poseen una fuerte capacidad oxidante, aunque esta capacidad varía dependiendo de la especie.⁷⁷ En la tabla 4 se ejemplifican algunas especies reactivas de oxígeno de importancia biológica, ya que son generados en varios sistemas celulares localizados en la membrana plasmática, el citosol, el retículo endoplásmico y la mitocondria.^{2,78} Las EROs interactúan con estructuras moleculares como el DNA, proteínas, lípidos y CHOs, lo que conduce a alteraciones metabólicas, generando daño molecular, que eventualmente resulta en algunas patologías (Fig. 11).

Tabla 4. Especies Reactivas de Oxígeno (Phaniendra, *et. al.* 2015)

Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)			
Radicales		No Radicales	
Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	$^{\circ}OH$	Oxígeno singulete	1O_2
Radical alcoxilo	RO°	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Radical peroxilo	ROO°	Ozono	O_3

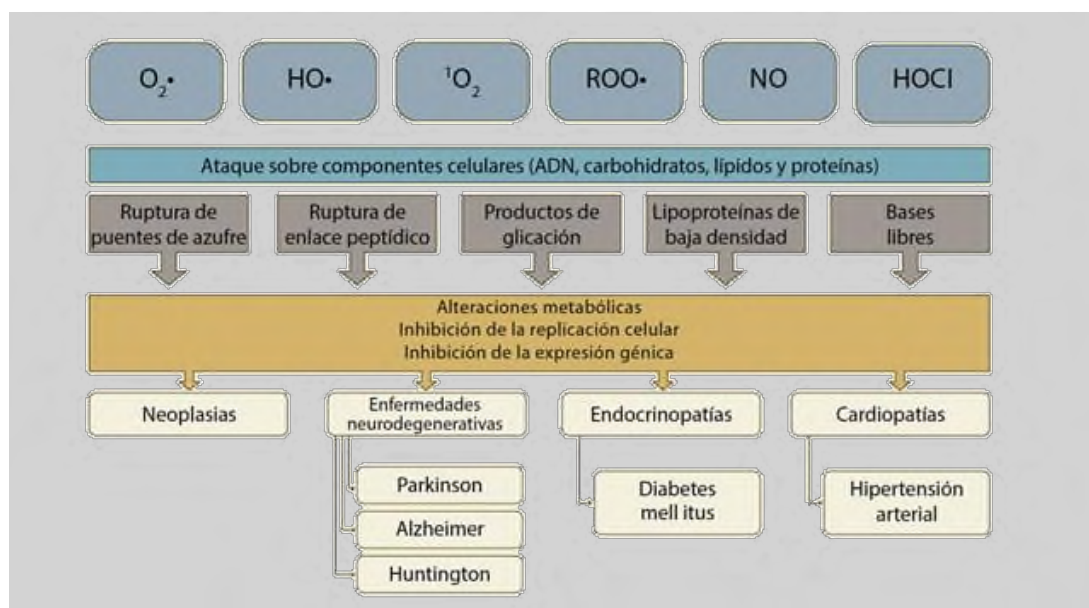


Figura 11. Papel de las EROs y ERNs en la fisiología de algunas enfermedades. (Hernández-Espinoza, *et al.* 2019)⁷⁹

Las diferentes especies reactivas pueden generar un estado conocido como estrés oxidativo, principalmente las de oxígeno: su generación, los sistemas que mantienen su nivel dentro de límites fisiológicos, su función normal y las consecuencias de un aumento de su nivel por encima del valor normal, condición conocida como estrés oxidativo.⁸⁰ Dicho estado, es definido como un desbalance entre la generación de especies reactivas y la defensa antioxidante.

Los mecanismos moleculares propuestos para explicar los daños causados por la hiperglucemia son varios y dependen en gran medida por los órganos que se analicen, algunos autores hasta el momento indican los siguientes: acumulación de productos de glicosilación avanzada; activación de la vía del sorbitol; activación de diversas vías mediadas por las proteínas quinasas C; activación de la vía de las hexosaminas y el incremento del estrés oxidativo.^{81,82}

1.8 Diabetes

La diabetes pertenece a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, la cual se debe a las anomalías en la secreción y/o acción de la insulina. Es decir, es consecuencia a una alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, caracterizada por niveles elevados de glucosa (hiperglucemia) debido a fallas o defectos en la acción de la insulina en las células β del páncreas.^{83,84}

De acuerdo con la Nueva Guía 2019 sobre Diabetes de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés),⁸⁵ la diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías generales:

- Diabetes tipo 1 (DM1): Debido a la destrucción autoinmune de las células β que conduce a una deficiencia absoluta de la insulina.
- Diabetes tipo 2 (DM2): Debido a la pérdida progresiva de la secreción de la insulina de las células β con frecuencia en el fondo de la resistencia a la insulina.
- Diabetes Mellitus Gestacional (GDM): Es la diabetes diagnosticada en el 2^{do} o 3^{er} trimestre de embarazo que no fue claramente evidente en la diabetes antes de la gestación.
- Diabetes por otras causas: Fibrosis quística, pancreatitis, diabetes inducida por medicamentos (glucocorticoides, en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos).

Dado que la enfermedad en su etapa inicial no produce síntomas, cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones como el infarto del miocardio, ceguera, falla renal, condiciones que generan amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura. La DM2 representa del 85 a 90% de los casos y esta se puede relacionar con factores de riesgo entre los cuales se pueden citar: antecedentes familiares, edad superior a 45 años, obesidad y falta de ejercicio.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay más de 250 millones de personas con diabetes, de las cuales el 90% son diagnosticados con DM2, lo que probablemente aumentará más del doble para el 2030. Se estima que un 30% de la población con DM2 no ha sido diagnosticada. Con respecto a este valor, La Federación de Diabetes Internacional (FID), ha estimado que desde el 2009 hasta el 2019 han aumentado los casos de personas que padecen esta enfermedad. En el 2009 se tenía una cifra de 285 millones de personas diabéticas, mientras que para el 2019 se estimaron 463 millones en el mundo las cuales se encuentran entre los 20 y 79 años de edad.⁸⁶

México se posicionó en el 6° lugar en el mundo, con 12.8 millones de personas. Los primeros tres lugares son China (116.4 millones), India (77.0 millones) y EEUU (31.0 millones), respectivamente.⁸⁷ De acuerdo con los datos del INEGI en el 2019, en México las mayores tasas de diabetes, determinadas por medio de la Entidad Federativa de Residencia Habitual (por cada 10 000 mil habitantes), se presentaron en Tabasco con 11.2, Veracruz de Ignacio de la Llave con 10.9 y Ciudad de México con 10.2, mientras que las más bajas se encontraron en Aguascalientes con 5.2, Sonora con 5.3, Nuevo León y Baja California, ambas con 5.4.⁸⁸

La Asociación Americana de Diabetes indicó que las recomendaciones sobre la dieta de los diabéticos han cambiado de forma importante en los últimos 80 años. Antes del descubrimiento de la insulina, en 1921, las personas con diabetes tipo 1 se mantenían vivas sólo durante unos meses gracias a dietas de inanición pobres en energía y muy pobres en hidratos de carbono. Cuando se dispuso del tratamiento con insulina, la inanición dejó de ser necesaria para sobrevivir y los pacientes pudieron volver a su peso normal. Sin embargo, se mantuvo la restricción en hidratos de carbono a sólo el 20% de la energía hasta 1950, cuando se hizo una revisión y se incrementó hasta el 40%. En 1971 se modificaron de nuevo estas recomendaciones y se permitió que un 45% de la energía total de la dieta procediera de los hidratos de carbono, el 35% de los lípidos y el 20% de las proteínas. En 1986, debido a la alta prevalencia de dislipemias y enfermedades cardiovasculares entre los diabéticos, se decidió que el porcentaje de grasa debería ser inferior al 30%, con un porcentaje de grasa saturada no superior al 10% del total de energía. Durante estos últimos años se ha planteado un dilema en cuanto al equilibrio entre hidratos de carbono y grasas en la dieta de los diabéticos. El resultado ha sido que las normas actuales de la ADA (1994) no establecen una única recomendación para los diabéticos, sino que obligan a valorar a cada uno de ellos de forma individual y establecer su tratamiento nutricional teniendo en cuenta las alteraciones y los objetivos terapéuticos específicos en cada caso. Por tanto, ya no existe una dieta para los diabéticos, sino una serie de normas que ayudan a los expertos en nutrición y a los pacientes a planificar la dieta más beneficiosa para un tratamiento médico óptimo y evitar, de esta manera, las complicaciones a largo plazo.⁸⁵

La ingesta de azúcar, como se ha mencionado en los párrafos anteriores, conduce a padecimientos en los cuales el metabolismo se encuentra descontrolado. Médicamente se cuenta con fármacos que pueden ayudar a controlar algunos de los síntomas de las enfermedades. De manera alterna se cuenta con la medicina tradicional y el conocimiento de las propiedades de diversas plantas. Algunas de ellas han sido más estudiadas que otras y también, muchas más se han comenzado a estudiar debido a las observaciones que se han llevado a cabo tanto por quienes cuentan con los conocimientos tradicionales como de los científicos que han puesto su atención en ellas.

1.9 Medicina tradicional

Desde siempre, las plantas han tenido una importancia económica en la humanidad, pues el ser humano ha encontrado en ellas su principal fuente de alimento; ha obtenido materiales combustibles y fibras para la fabricación de papel y telas. También ha descubierto plantas productoras de diferentes compuestos que, utilizadas en pequeñas dosis, alivian dolores, mitigan la fatiga y contrarrestan los síntomas de muchas enfermedades. Esto último se debe a que las plantas contienen principios activos que ejercen acciones farmacológicas beneficiosas o perjudiciales sobre las diferentes formas de vida y es aquí de donde surge su utilidad para servir como medicamentos alternos.⁸⁹

El principio de la medicina tradicional o medicina naturista se basa en terapias espirituales o técnicas manuales con ayuda de recursos naturales ya sean plantas, animales o minerales; esto con el fin de mantener la salud individual y comunitaria.⁹⁰ La medicina tradicional ha desempeñado un rol fundamental en el tratamiento de afecciones debido a que a través de los años el ser humano ha utilizado a la naturaleza para satisfacer sus necesidades primordiales desde la alimentación hasta el uso de cosméticos, sin olvidar a la medicina.⁹¹

La base primordial de la medicina tradicional son las plantas las cuales, desde hace miles de años, se han usado para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del ser humano.⁵³ No obstante, el manejo de los productos naturales ha ido cambiando conforme el conocimiento humano crece; aumentando los procesos terapéuticos de forma positiva, examinando sus componentes y con esto ayudando al desarrollo de la medicina científica. De la misma manera también se han descubierto los efectos malignos que muchas plantas pueden ocasionar. Todo lo anterior provoca que para obtener conocimientos químicos, farmacológicos y clínicos se desarrollen métodos analíticos que validen el control de calidad de los compuestos extraídos y utilizados.^{92,93} Durante más de 200 años las Ciencias Químicas y Biológicas se han enfocado en el estudio y en el aislamiento de extractos naturales y gracias al Diccionario de Productos Naturales⁹⁴ se conocen más de 165, 000 datos químicos, estructurales, y bibliográficos de productos naturales y compuestos similares.⁹⁵

A pesar de en la actualidad se cuenta con el equipo y el personal capacitado para acudir a la medicina científica, se cree que cerca del 80% de la población en los países de desarrollo dependen de la medicina tradicional para sus necesidades básicas empleando principalmente plantas.⁹⁶ De igual forma la OMS estima que cerca del 80% de la población mundial recurre a los productos naturales para saciar sus necesidades básicas, principalmente la alimentación y para aliviar muchas de sus dolencias. Esto último implica el uso de extractos de plantas o sus compuestos activos.⁹⁷ Este tipo de extractos se conocen como medicamentos fitoterapéuticos y sirven para combatir afecciones leves, moderadas o crónicas, aunque algunos no son muy apropiados para afecciones agudas o de emergencia que requieran hospitalización urgente.

Cabe mencionar que de igual forma que los medicamentos sintéticos, en los productos naturales también existen grados de potencia, por ejemplo:

- 1) Muy potentes. Por ejemplo, la digoxina, extraída de *Digitalis lanata* la cual se utiliza para enfermedades del corazón.
- 2) De potencia relativamente baja, como las hojas de manzanilla, comúnmente se utilizan para trastornos digestivos.
- 3) Potencia intermedia entre ellas la flor de árnica cuya principal función es para traumatismos y torceduras, así también para irritación, dolores articulares y reumáticos.⁵⁴

El efecto de los productos naturales varía, entre otras cosas, dependiendo de qué tan susceptible es la persona a sus efectos. Aun así, existe un sinnúmero de productos naturales bioactivos que se han aislado a partir de plantas y resultan importantes porque se utilizan como prototipos para la síntesis y el desarrollo de nuevos medicamentos y también funcionan como ensayos bioquímicos para entender la farmacología humana y de animales que se encuentran en desarrollo. En la tabla 5, se muestran algunos productos naturales provenientes de plantas, su fuente de extracción y el uso clínico.^{57,98,99}

Tabla 5. Productos Naturales bioactivos y fuente de proveniencia.

Producto	Fuente	Actividad farmacológica/ Uso clínico
Diogexina, digitoxina, deslanoside	<i>Digitalis purpurea</i> y <i>D. lanata</i>	Acción inotrópica positiva sobre el miocardio.
Quinidina	Corteza del árbol <i>Cinchona</i>	Antiarrítmico.
Papaverina	<i>Papaver</i> spp.	Vasodilatador.
Cocaína	Hojas de <i>Erythroxylum coca</i> .	Bloqueo nervioso.
Lidocaína, benzocaína, dibucaína	Síntesis basadas en el precursor de la cocaína.	Anestésicos.
Camptotecin	Árbol chino <i>Camptotheca acuminata</i>	Antineoplásico
Hermine (alcaloide)	<i>Peganum harmala</i>	Antiviral de amplio espectro.

1.9.1 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son conocidas desde hace miles de años y son, hasta la actualidad, muy bien aceptadas por el mundo ya que representan una rica fuente de agentes terapéuticos. Algunos de estos agentes difieren en puntos de ubicación de las plantas, se pueden encontrar en mayor cantidad en las hojas, en los tallos o en la raíz.¹⁰⁰ En este trabajo se evaluará una planta nativa de Madagascar, *Kalanchoe pinnata* (KP), la cual tiene una excelente producción en varias partes de país incluido el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec – Oaxaca. La variedad utilizada en este trabajo proviene del municipio de Texcoco, en el Estado de México.

1.9.2 Género *Kalanchoe*

La especie *Kalanchoe* es una planta originaria de Madagascar, cuenta con alrededor de 125 especies y pertenece a la familia de las Crasuláceas, las cuales han sido como una especie invasiva en zonas desérticas de países como España, Puerto Rico, Estados Unidos, Sudáfrica, Venezuela y México. Algunos de los nombres comunes de esta planta son “espinazo del diablo, mala madre, madre de miles” entre otros. Esta especie puede llegar a medir desde los 1.5 hasta los 6 metros de largo dependiendo del subgénero en el cual se encuentren posicionadas. Por sus características invasivas, se ha reportado que puede inhibir la repoblación de plantas nativas modificando los compuestos del suelo en zonas semiáridas.^{101, 102}

Aunque tiende a ser una especie invasora, la planta *Kalanchoe* ha sido aceptada en la rama de medicina tradicional, particularmente las especies *pinnata*, *daigremontiana*, *brasilinses* ya que han presentado actividades antitumorales, antihistamínicas, antiinflamatorias, antibacterias e inmunomoduladoras.¹⁰³

K. daigremontiana ha sido utilizada como antiinflamatorio, antiséptico y también ha estado presente en distintos tratamientos contra el cáncer ya que se han podido aislar esteroides cardiotónicos bufadienólicos, los cuales presentan efectos inhibitorios sobre el virus *Epstein-Barr* que puede atacar a los linfocitos B y se asocia con el desarrollo de neoplasias.¹⁰⁴ Investigadores como Kruck aislaron de las hojas una nueva forma de vitamina E, los β -, γ -, δ -tocomonoenoles, los cuales presentan una relación biosintética con los tocoferoles y los tocotrienoles, así también como la presencia de triterpenoides y ácidos grasos de cadena larga.^{105,106}

El extracto de las hojas de *K. brasilinses* presenta efectos antiinflamatorios. En el caso del reumatismo, se cree que el uso constante de esta planta puede aumentar los mecanismos de defensa o reducir las respuestas inmunitarias negativas en las que se encuentra la artritis reumatoide.¹⁰⁷ Ibrahim utilizó el zumo extraído de las hojas de *K. brasilinses* para obtener resultados que avalaron la respuesta anti-inflamatoria de esta planta,

ya que el grupo de investigación se dio cuenta que este extracto inhibía la respuesta proliferativa de los linfocitos humanos.

Kalanchoe pinnata, crece en Colombia, Ecuador, Panamá, Venezuela y México. Se le conoce con muchos nombres, entre ellos: Hierba bruja, flor del aire, hoja bruja, mala madre y siempre viva.¹⁰⁸ Puede llegar a medir un metro de altura y posee hojas carnosas, espesas y poco ramificadas. Esto se muestra en la figura 12.

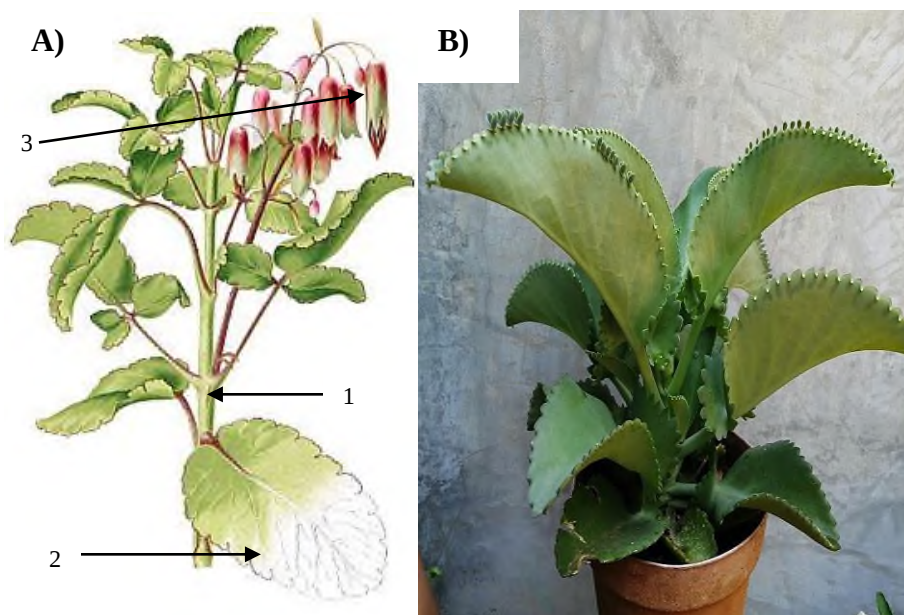


Figura 12. *Kalanchoe pinnata*. A) Imagen de referencia de la planta en donde 1) Tallo, 2) Hojas, 3) Flores. (https://es.wikipedia.org/wiki/Kalanchoe_pinnata), B) *K. pinnata*, recolectada para este trabajo.

Tradicionalmente, el zumo de las hojas ha sido usado para el tratamiento de afecciones como tos, heridas, golpes, quemaduras, dolores de cabeza, fiebre, picaduras de insectos, como ayuda enfermedades respiratorias; antiinflamatorio y cicatrizante. La forma de administración se realiza mediante infusiones, ungüentos, jarabes, o usando las hojas directamente. En partes de Latinoamérica como Perú, Brasil y México no solo utilizan las hojas, sino también la raíz o el tallo, y no solo la combinan con agua, sino que también crean elixires.¹⁰⁹ Actualmente se han realizado diversas determinaciones químicas para identificar sus fitoconstituyentes. Los estudios han reportado alcaloides, triterpenos, glucósidos, flavonoides, cardienólidos, esteroides, bufadienólido, briofilina, briofilol, briofolona, briofolenona, briofinol y bersaldegenina. Además, las hojas de KP contienen compuestos químicos llamados bufadienólidos, entre ellos las brotoxinas A, B y C, que son muy similares en estructura y por lo tanto en sus propiedades antibacterianas, antitumorales,

anticancerígenas, insecticidas y antiinflamatorias.¹¹⁰ Algunos de los compuestos mencionados se muestran en la figura 13.

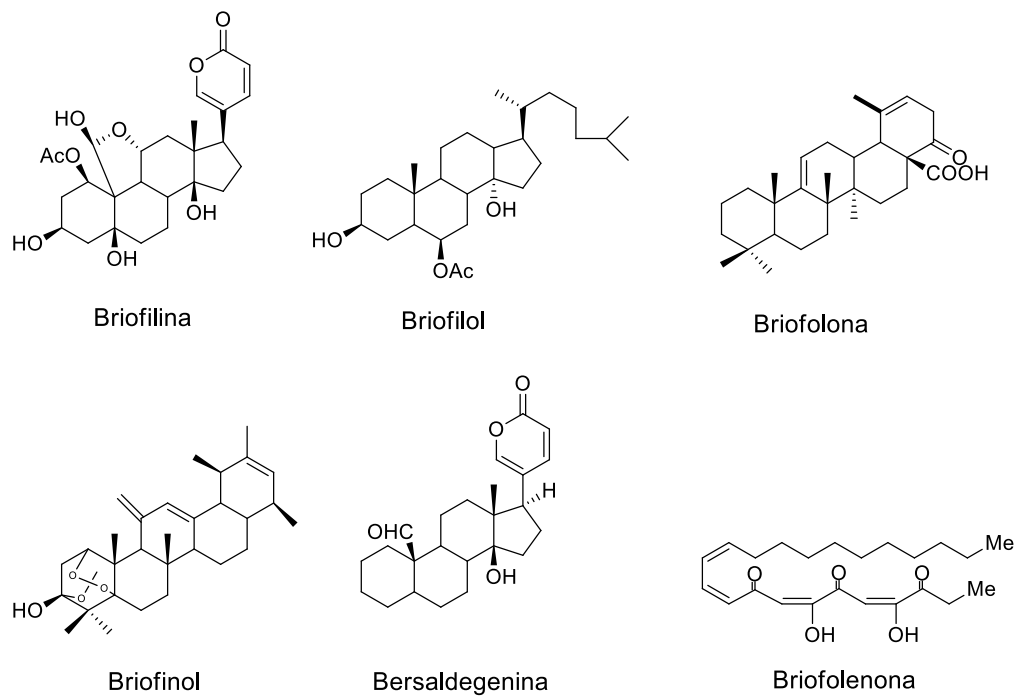


Figura 13. Metabolitos reportados en *Kalanchoe pinnata* (Seema 2012).

CAPITULO 2: ANTECEDENTES

2.1 Roedores expuestos a altas concentraciones de azúcar

En 1994, Ramos *et. al.* establecieron que la abundancia calórica facilita la obesidad y la diabetes en humanos y roedores, al igual que los factores ambientales. Su equipo de investigación observó que cuando las ratas arenosas del desierto (*Psammomys obesus*) se alimentaban con una dieta vegetal nativa en cautiverio, no desarrollaban obesidad y se volvían euglucémicas e hipometabólicas y que cuando ingerían altas concentraciones de calorías, aproximadamente el 33% de los roedores se volvían hiperfágicos (consumen más alimento), hiperinsulinémicos y ligeramente hiperglucémicos.¹¹¹

En 2015, Kanaly realizó experimentos utilizando la técnica de la “dieta de cafetería (CAF)” con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia a la obesidad en ratones Balb/c. Esta dieta consistió en un acceso libre a comidas con alta densidad calórica. Como resultado se observó un aumento en la biomasa de los ratones (obesidad) y se comprobó que la dieta de cafetería influyó, de manera diferente, entre ratones susceptibles a obesidad y ratones obesos resistentes.¹¹²

En 2016, Meza *et. al.*, establecieron que cuando las ratas son expuestas a una dieta rica en carbohidratos estas tienden a incrementar el consumo de alimento y en consecuencia de ello hay un incremento en el peso corporal.¹¹³

En 2017, el grupo de Dupas, evaluó el síndrome metabólico y la hipertensión como posible resultado de los efectos a largo de la suplementación con fructuosa en ratas Wistar, para ello utilizó machos de 3 semanas a los que se les administró una solución azucarada del 20 al 25% (peso/volumen) durante un periodo de 21 semanas. Se midió la presión arterial, la glucemia en ayunas y el peso corporal. Como resultados se encontró que, al administrar esta suplementación, hubo una inducción temprana de hipertensión sin insuficiencia renal, desarrollo progresivo de hiperglucemia en ayunas y resistencia a la insulina sin modificación de la tolerancia a la glucosa. Además de presentar dislipidemia (triglicéridos plasmáticos más altos) y signos de daño hepático. Con respecto al síndrome metabólico, se concluyó que desarrollaron hipertensión y resistencia a la insulina, pero no diabetes mellitus tipo 2.¹¹⁴

2.2 Diabetes e hiperglucemia

La insulina es una hormona secretada por las células- α del páncreas en respuesta a diversos estímulos, cuya función principal es mantener la homeostasis glucémica y de otros sustratos energéticos. Por lo cual, después de la cada comida, la insulina suprime la liberación de ácidos grasos libres promoviendo la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo. Por otra parte, la insulina suprime la producción hepática de glucosa, mientras favorece la captación de glucosa por el tejido muscular y adiposo.¹¹⁵

En 2020, el grupo de García indujo el desarrollo de diabetes mellitus tipo II en ratas recién nacidas aplicando estreptozotocina (0 – 30 mg/kg) con la finalidad de observar las diferencias en plasma y tejido de algunos mediadores de inflamación en ratas normales y ratas con diabetes tipo 2. Tras la insuficiencia renal, las ratas diabéticas mostraron un aumento de las concentraciones plasmáticas de hidroperóxidos lipídicos (determinados espectrofotométricamente con ayuda de un kit comercial), óxido nítrico (se midió como $\text{NO}^-_2 + \text{NO}^-_3$, por la reacción de Griess) y moléculas de adhesión endotelial (determinación por el método Elisa).¹¹⁶

En 2009, Jaiswal *et. al.*, evaluaron el efecto de la terapia con extracto acuoso de las hojas *Moringa oleifera* sobre el control glucémico, hemoglobina, proteína total, azúcar en orina y peso corporal administrando por vía oral dosis variables de 100, 200, 300 mg/kg de extracto acuoso para evaluar sus efectos hipoglucemiantes y antidiabéticos sobre la glicemia en ayunas. Obteniendo como resultado que la dosis de 200 mg/kg disminuyó los niveles de glucosa en sangre de animales control en un 26.7 y 29.9 % durante el análisis de glicemia en ayunas, en ratas con diabetes en etapa inicial la misma dosis ocasionó un descenso del 32.8% en la tolerancia oral a la glucosa. Después de 21 días de tratamiento la proteína total, el peso corporal y la hemoglobina aumentaron en un 11.3, 10.5 y 10.9 %, respectivamente.¹¹⁷

En 2012, González y su grupo de investigación, determinaron el daño oxidativo en ratas Wistar macho a las cuales se les indujo hiperglucemia. Lo anterior se logró elaborando una mezcla al 35 % de sacarosa en agua de bebida la cual se administró durante un período de 4 meses. Como resultado se obtuvo un incremento en los valores de glicemia, colesterol y triglicéridos en las ratas expuestas a la solución de sacarosa. Los resultados obtenidos determinaron que se había alcanzado un estado inicial de daño oxidativo, caracterizado por un moderado incremento de especies reactivas de oxígeno, que resultaron insuficientes para provocar alteraciones fisiológicas en la membrana de los eritrocitos.¹¹⁸

En el 2013, Ballesteros *et. al.* utilizaron un modelo experimental de hiperglucemia e hiperlipidemia inducida por una solución de sacarosa al 35% en ratas Wistar durante un periodo de 4 meses, esto con fin de realizar una evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), también se determinaron los niveles de glicemia, lípidos plasmáticos. Como resultado, se obtuvo un incremento significativo de la actividad enzimática de CAT observándose una fuerte relación entre los niveles de triglicéridos y la actividad de dicha enzima.¹¹⁹

En 2016, Esteves-Mar llevó a cabo la inducción de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) por administración, durante 4 semanas, de una dieta alta en azúcares, lípidos y colesterol a ratas Wistar a las cuales se les administró

posteriormente estreptozotocina. Lo anterior se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la actividad de jugos ricos en polifenoles administrados a ratas Wistar con diabetes mellitus tipo 2. Se les administró, vía oral, 500 ml de extractos de frutos rojos (zarzamoras, uvas y fresas) durante un periodo de 28 días, obteniendo como resultado una reducción del peso corporal de los roedores, mientras que, en los niveles de colesterol, glucosa, triglicéridos no hubo un incremento significativo.¹²⁰

En el 2019, Naranjo *et. al.*, evaluaron el peso corporal, el tejido adiposo e indicadores metabólicos (glucosa, triglicéridos y colesterol total), en ratas Wistar expuestas a bebidas con endulzantes calóricos, con sacarosa 10%, alta fructosa 10%, dextrosa 10% durante la gestación y lactancia. Concluyendo que las bebidas con endulzantes calóricos provocan un aumento en el tejido adiposo. Sin embargo, no hay cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol y triglicéridos con respecto al grupo control.¹²¹

En el 2019, Chimal-Muñoz *et. al.*, evaluaron el efecto de la hiperglucemia por un tiempo prologando a nivel sistémico en ratas Wistar tratadas con insulina a niveles normoglucemiantes, administrando aloxano (150 mg/kg). Se obtuvo, como resultado, un modelo de hiperglucemia, en el cual se observó, a nivel hepático, dilatación de sinusoides, esteatosis de gota gruesa y bajo recuento celular. Concluyendo que la insulina empleada no inhibe los efectos histológicos, bioquímicos y conductuales de la hiperglucemia a largo plazo.¹²²

En el 2020, Bequer *et. al.* estudiaron el efecto de la hiperglucemia moderada pregestacional sobre la morfología fetal en un modelo de diabetes experimental. La diabetes se indujo por inyección subcutánea de estreptozotocina (100 mg/kg) en ratas Wistar hembras, realizando al día 20 de gestación la cesárea y sacrificio para extraer los fetos y placentas, y analizarlos individualmente. Como resultado se obtuvo que los fetos hiperglucémicos presentaban una reducción de las dimensiones fetales, craneofaciales y placentarias, concluyendo que este tipo de modelo experimental puede ser útil para identificar los mecanismos implicados en la gestación diabética humana.¹²³

2.3 *Kalanchoe pinnata*

En 1990, Akihisa *et. al.*, identificaron los grupos principales de *Kalanchoe pinnata* (Fig. 14) mediante la pulverización de la materia seca utilizando hojas y tallos. Para realizar la caracterización de los compuestos se realizó una extracción Soxhlet con CH₂Cl₂ y una saponificación con KOH al 5%. Dieciocho esteroides fueron aislados mientras que cuatro fueron identificados como nuevos (1j, 1p, 2m y 3m).¹²⁴

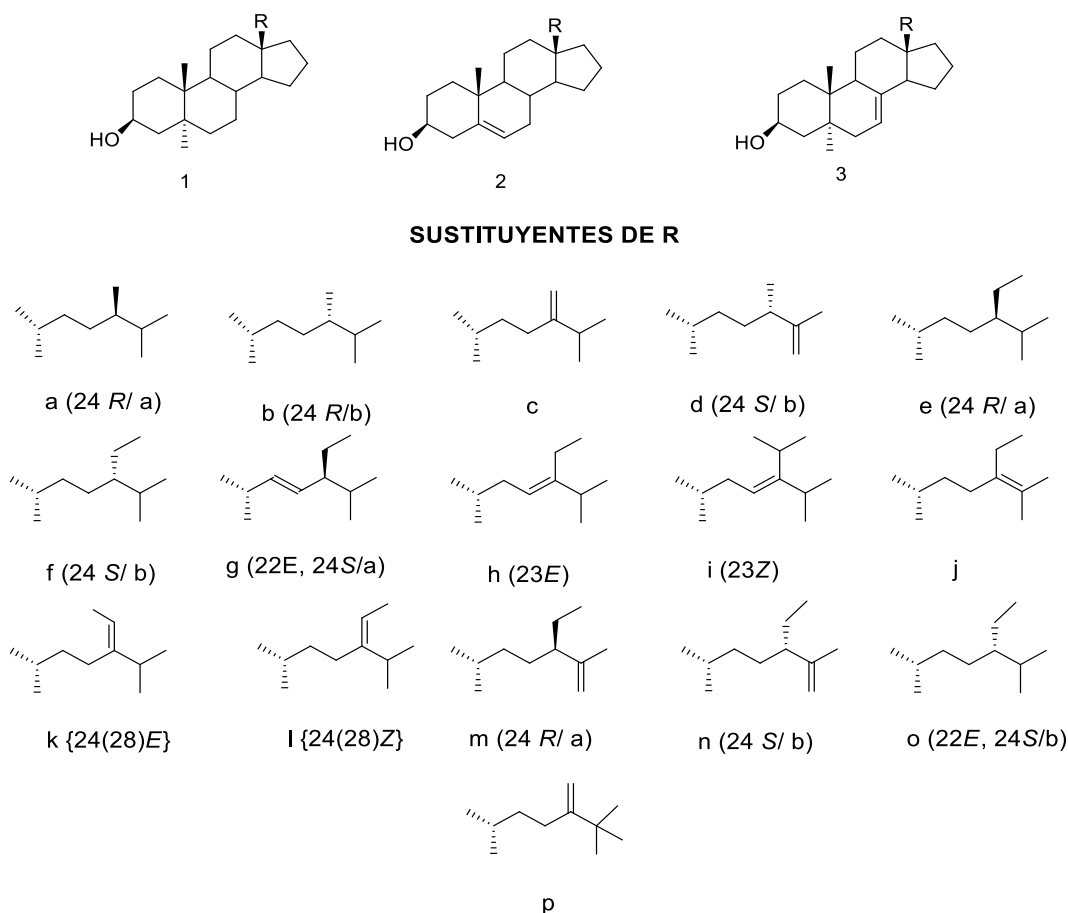


Figura 14: Estructura de los esteroides (Akihisa 1990).

En 1996, Yamagish *et. al.*, realizaron el aislamiento de la Briofilina-B, el cual es un agente antitumoral mediante una maceración con agua y una extracción con *n*-butanol. El extracto se obtuvo mediante un homogenizado de 10 kg de planta fresca en 2 litros de agua, los residuos (A) se concentraron en CHCl_3 , mientras que el sobrenadante se concentró en 1.5 litros de CHCl_3 a 40°C. El extracto de CHCl_3 se etiquetó como la muestra B, mientras que a la fase acuosa de le añadieron 1.5 litros de *n*-butanol. A la fase orgánica (*n*-butanol) se le realizó una cromatografía en gel Sephadex LH-20 (4x38 cm) en HPLC-fase reversa, para obtener un rendimiento de briofilina-B del $4.3 \times 10^{-05} \%$.¹²⁵

En el 2006, Salahdeen *et. al.*, evaluaron los efectos neuro farmacológicos de las hojas y tallos de *Kalanchoe pinnata* mediante una maceración con agua destilada en ratones, aplicando dosis de 50, 100 y 200 mg/kg. Obteniendo como resultado una disminución de la actividad neurológica de forma dependiente a la dosis. Con estos datos, los autores pudieron afirmar que el extracto, además de mostrar un efecto sedante posee una acción depresora sobre el sistema nervioso central.¹²⁶

En el 2014, Aransiola *et. al.*, demostraron la propiedad antidiabética del extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata* usando ratas diabéticas (ratas albinas) como modelo. Al mismo tiempo, se comparó el efecto antidiabético del extracto acuoso con el de una muestra que contenía una mezcla del extracto y un medicamento comercial para la diabetes (glibenclamida). Se administró una dosis específica de extracto acuoso de hojas de KP (200 mg/kg) a las ratas diabéticas, se midió y registró su nivel de glucosa en sangre. Los resultados mostraron un descenso significativo en el nivel de glucosa en sangre de las ratas diabéticas a un valor cercano al nivel normal de glucosa en sangre en aproximadamente 2 horas cuando solo se utilizó extracto acuoso de hojas de KP. Cuando se administró una muestra que contenía una mezcla del extracto acuoso y glibenclamida, se observó un descenso mayor del nivel de glucosa en sangre. Con ello pudieron concluir que el extracto acuoso de las hojas de KP posee importantes propiedades antidiabéticas y que el rendimiento de los fármacos existentes (glibenclamida) podría mejorarse con el uso del extracto acuoso.¹²⁷

En 2014, Kamal *et. al.*, determinaron la actividad antibacteriana, antifúngica y la fitotoxicidad de las hojas y tallos de *Kalanchoe pinnata* contra los siguientes componentes de la microbiota intestinal: *Bacillus epidermis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermis* y *Escherichia coli* también contra *Epidermophyton floccosum*, *Trichophytum mentogrophytes*, *T. rubrum*, *T. simii*, *T. scheonleinii*, *Microsporum canis*, *Pseudallescheria boydii* y *Cándida albicans* mediante el método de difusión en disco. Los resultados mostraron que los extractos probados poseían actividades antimicrobianas y antifúngicas leves o no significativas. El extracto elaborado con CH₂Cl₂ con metanol presentó menos zona de inhibición en comparación con el extracto acuoso. Por lo cual se concluyó que el los extractos de CH₂Cl₂ con metanol presentaron actividades antibacterianas y antifúngicas no significativas.¹²⁸

En el 2016, Nickhil *et. al.*, evaluaron la actividad de la ATPasa de la membrana de los glóbulos rojos y los niveles de antioxidantes en ratas inducidas a diabetes mediante estreptozotocina (60 mg/kg). Se les administró una preparación acuosa de las hojas de *Kalanchoe pinnata* (0.14 g / kg) durante 30 días. Teniendo como resultado una pérdida de peso y reducción en el consumo de alimentos, al igual que una reducción de los niveles de glucosa en suero. Los niveles de SOD y glutatión no se elevaron significativamente, sin embargo, la actividad de CAT sí aumento en el grupo diabético. Concluyendo que el consumo de una preparación acuosa de KP puede reducir el estrés oxidativo y mejorar la disponibilidad de Mg celular a través de aumento en la ATPasa.¹²⁹

En el 2020, Ramón *et. al.*, determinaron el efecto de la preparación combinada de *Kalanchoe pinnata* y metformina sobre la inflamación mediada por citocinas en células musculares esqueléticas normales y diabéticas. Los resultados mostraron que las preparaciones mantuvieron la viabilidad celular por 3 días en

células de los mioblastos del músculo esquelético humano y del músculo esquelético diabético. Sin embargo, al día 5 presentó una disminución significativa en la viabilidad celular de ambas líneas celulares. Por lo que esta mezcla pudo, posiblemente, modular respuestas inmunitarias mediante la regulación positiva significativa de los marcadores proinflamatorios, la interleucina 2 y el factor de necrosis tumoral alfa, y la regulación positiva del marcador antiinflamatorio. Por lo tanto, se concluyó que preparaciones combinadas de *Kalanchoe pinnata* y metformina podrían ser un agente inmunomodulador potencial que puede promover la inflamación y afectar negativamente el resultado de los pacientes diabéticos.¹³⁰

En 2020, Araujo *et. al.*, determinaron la actividad cicatrizante de un extracto por maceración de las hojas de *Kalanchoe pinnata*. Comparando dos cremas que contenían un extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* al 6 y 0.15 %. Ambas cremas se evaluaron tópicamente en un modelo de escisión de rata durante 15 días. En el día 12, los grupos tratados con extracto de hoja y cremas de flavonoides en exhibieron $95,3 \pm 1,2\%$ y $97,5 \pm 0,8\%$ de curación, respectivamente. Como conclusión se estableció que los glicósidos de flavonol fueron los principales compuestos fenólicos en el extracto de hoja de *Kalanchoe pinnata* según el análisis HPLC-ESI-MS/MS. Concluyendo que el flavonoide mayor *Kalanchoe pinnata* podría jugar un papel fundamental en la cicatrización de heridas y de esta manera los resultados observados con ambas cremas indicaron que el uso del extracto crudo de *Kalanchoe pinnata* debió ser más rentable que el compuesto aislado.¹³¹

En 2020, Agüero *et. al.*, demostraron las propiedades antidiabéticas de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Kalanchoe pinnata* a través de la realización de extractos de las hojas mediante infusión y decocción utilizando una mezcla agua:etanol (70:30) como disolvente. Para determinar la actividad hipoglucémica en ratas, se administraron extractos por vía oral a dosis de 250, 500 y 750 mg / kg y se controlaron los niveles de azúcar en sangre durante un período de cuatro horas utilizando un glucómetro. Como resultado se observó que el tratamiento con 750 mg/kg de infusión indujo una reducción estadísticamente significativa del azúcar en sangre a los 90, 180 y 240 min, mostrando la existencia de un efecto hipoglucemiante de este extracto.¹³²

En 2020, Sudriman determinó el efecto antiinflamatorio de la infusión de *Kalanchoe pinnata* contra la inflamación en el muslo de la pierna de ratones machos *Swiss Webster* y determinaron las relaciones entre el aumento de las concentraciones y el aumento del efecto antiinflamatorio. Se utilizaron ratones *Swiss Webster* machos a los cuales se les administró una infusión de *Kalanchoe pinnata* en concentraciones de 20, 40 y 80 %. La inflamación en los muslos de los roedores fue inducida mediante una inyección al 1% de ácido acético. Como conclusión se estableció que la infusión de *Kalanchoe pinnata* ayudó a disminuir la inflamación en el muslo de ratones, sin embargo, la concentración de hojas de *Kalanchoe pinnata* utilizada en la infusión no fue suficiente para disminuir al 100% la inflamación del muslo de los ratones.¹³³

Existen muchas comunidades indígenas alrededor de todo el mundo y gran número de ellas utilizan las plantas medicinales. Se han reportado diferentes usos en distintos países y las comunidades que habitan en ellos. Un trabajo reportado por Bermúdez y Granger menciona el uso de varias especies de *Kalanchoe pinnata* en algunas partes del siguientes.

“Bangladesh: Para tos, moco, fiebre, epilepsia, estreñimiento, hemorroides.

Brasil: Para abscesos, adenoides (infectados), artritis, pie de atleta, forúnculos, bronquitis, bubos, quemaduras, callosidades, conjuntivitis, tos, dermatitis, dermatosis, dolor de oído, eczema, edema, erisipela, fiebre, glaucoma, dolor de cabeza, infecciones, inflamación, picaduras de insectos, problemas intestinales, picazón, cálculos renales, trastornos linfáticos, úlceras en la boca, nerviosismo, infecciones respiratorias, reumatismo, escorbuto, problemas en la piel, dolor de muelas, tuberculosis, tumor, úlceras, insuficiencia urinaria, verrugas, tos ferina, heridas y como sedante.

Ecuador: Para contusiones, huesos rotos.

Estados Unidos: Para varicela, fiebre, dolor de estómago.

Guatemala: Para dolores, diarrea, problemas de la piel.

Himalaya: Las hojas se aplican sobre heridas, contusiones, hinchazón y picaduras de insectos.

India: Para molestias abdominales, forúnculos, hematomas, cólera, cortes, diabetes, diarrea, disentería, flatulencia, dolores de cabeza, cálculos renales, indigestión, picaduras de insectos, sarna, llagas, insuficiencia urinaria, heridas.

México: Para infecciones oculares, dolores de cabeza, inflamación, trastornos menstruales, granos, heridas.

Nicaragua: Para dolores, quemaduras, parto, resfriados, tos, fiebre, dolor de cabeza, dolor, infecciones respiratorias.

Nigeria: Para tos, dolor de oído, eccema, inflamación, granos.

Perú: Para infecciones bacterianas, forúnculos, huesos rotos, bronquitis, cáncer (linfoma), conjuntivitis, tos, dolor de oído, infecciones oculares, epilepsia, erisipela, fiebre, gases, dolor de cabeza, acidez estomacal, inflamación, problemas intestinales, migraña, náuseas, problemas de la piel, llagas, úlceras, uretritis.

Vietnam: Como tratamiento antibacteriano y antiinflamatorio”.¹³⁴

CAPITULO 3: JUSTIFICACIÓN

En México la tasa de mortalidad debida a enfermedades metabólicas es alta debido a que no se les ha dado la difusión necesaria entre la población. Esto trae como consecuencia poco conocimiento de ellas y de los factores que las desencadenan. Uno de estos factores se relaciona con la existencia de niveles altos de azúcar en sangre como consecuencia del consumo de alimentos y bebidas que contienen altas concentraciones de carbohidratos como la sacarosa.

De la misma manera existe un amplio conocimiento de las propiedades de muchas plantas que poseen propiedades medicinales pero que, por falta de conocimiento y estudio, no se utilizan para contrarrestar algunos de los síntomas, complicaciones e incluso enfermedades para los que pueden ser utilizadas. Muchas veces se ha menospreciado el conocimiento que, de muchas plantas, tienen algunas personas y que han adquirido a través de generaciones.

En este trabajo se estudió una condición detonante de muchas enfermedades conocida como hiperglucemia empleando un modelo consistente en la administración, vía oral, de una solución alta en azúcar utilizando el modelo de la dieta de la cafetería, ya que este replica las condiciones normales mediante las cuales se puede ingerir una cantidad elevada de carbohidratos. De la misma manera se estudió el efecto que la planta *Kalanchoe pinnata*, podría tener como posible regulador de las concentraciones de glucosa en sangre, así como del metabolismo de los roedores expuestos a azúcar.

Los resultados obtenidos proporcionarán conocimientos sobre los efectos que la administración de la planta *Kalanchoe pinnata* tendrá sobre las alteraciones metabólicas ocasionadas en animales expuestos a altas concentraciones de azúcar. Si los resultados son favorables, se podrán establecer nuevos estudios incluyendo nuevas variantes para continuar con el análisis de las propiedades medicinales de esta planta. El estudio de las plantas medicinales resulta de vital importancia debido a que se sabe que muchos fármacos sintéticos pueden tener efectos adversos. Lo anterior impulsa el estudio de los recursos vegetales para beneficio de la salud.

CAPÍTULO 4: HIPÓTESIS

El uso de extractos acuosos de las hojas de *Kalanchoe pinnata* podrían tener actividad antiinflamatoria, antioxidante y/o anti hiperglucémica en ratas Wistar expuestas a altas concentraciones de azúcar por vía oral.

CAPITULO 5: OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar las propiedades antiglucémicas, antioxidantes y antiinflamatorias de *Kalanchoe pinnata* en ratas Wistar expuestas a concentraciones elevadas de azúcar por vía oral.

5.2 Específicos

1. Determinar el nivel de glucosa en sangre en los siguientes grupos de estudio: control; expuestos a una solución al 20% de sacarosa; expuesto a sacarosa y al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata*; y tratados con el extracto acuoso en un periodo de 60 días.
2. Realizar Exámenes Generales de Orina (EGO) en todos los grupos experimentales.
3. Evaluar la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en hígado, riñón y páncreas de los grupos tratados de ratas.
4. Determinar la actividad de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD), Glutación-S-Transferasa (GST), Proteína-C Reactiva (PCR) y Citocromo C oxidasa, en los grupos establecidos de ratas.
5. Monitorear la variación de peso en los grupos establecidos de ratas.
6. Realizar la caracterización de fitoconstituyentes en un extracto acuso de *Kalanchoe pinnata*.

CAPÍTULO 6: METODOLOGÍA

6.1 Metodología cualitativa para la determinación de fitoconstituyentes presentes en *Kalanchoe pinnata*

6.1.1 Recolección de *Kalanchoe pinnata*

Kalanchoe pinnata se recolectó en el centro del municipio de Texcoco (coordenadas Latitud: 19.5126, Longitud: -98.8798, 19° 30' 45" Norte, 98° 52' 47" Oeste a 2220 metros sobre el nivel del mar), en el Estado de México, y se trasladó al municipio de Tuxtepec, Oaxaca, en donde fue sembrada en las colonia obrera (coordenadas Latitud: -96.169444, Longitud: 18.020000 a 49 metros sobre el nivel del mar) y en la colonia Nueva Florencia (coordenadas Latitud: 18.0839550 y Longitud: -96.1714360, 18°5'2" Norte -96°10'17" Oeste a una altura aproximadamente de 20 metros sobre el nivel del mar) a una distancia de 6 km de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca

6.1.2 Extracción asistida por ultrasonido

Para la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), se utilizaron hojas frescas de un peso aproximado de 10 g cada una. Se redujo el tamaño de tal forma que cupieran sin problemas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Al matraz se le adicionó 200 g de materia vegetal y 100 mL de una solución agua-metanol (1:1). Una vez que el matraz estaba colocado dentro del equipo de ultrasonido (BRANSON 1510) se procedió a hacer 3 ciclos ultrasónicos, con una frecuencia de 40kHz, de 10 minutos cada uno, con un tiempo de descanso de 10 segundos entre cada ciclo (Fig. 15).



Figura 15. Extracción Asistida por Ultrasonido. a) Equipo de EUA. b) Matraz Erlenmeyer con la materia vegetal dentro del equipo EAU.

6.1.3 Extracción rápida de agua caliente presurizada

Para la Extracción Rápida de Agua Caliente Presurizada (ERACP), se utilizaron hojas frescas de 10 g cada una aproximadamente. Se utilizó una cafetera express convencional (TAURUS, *espresso coffe maker*). Se redujeron de tamaño y se introdujeron en el portafiltro de café, que es un pequeño contenedor en forma de copa donde se coloca la capsula de café. Seguido de esto se añadió 300 mL de agua destilada en el contenedor de agua de la cafetera. Debido a que el agua caliente dañó la materia vegetal solo se hizo una extracción de 1 ciclo con un tiempo aproximado de 3 minutos.

6.1.4 Ensayos químicos para la determinación de fitoconstituyentes presentes en *Kalanchoe pinnata*

Las pruebas químicas se realizaron sobre el extracto obtenido de cada uno de los métodos anteriormente planeados, colocando cantidades de extracto desde 1 mL hasta 5 mL en tubos de ensaye de 16x150. De acuerdo con Yadav¹³⁵ *et. al*, se establecieron los criterios, parámetros y condiciones para la identificación de metabolitos presentes en la materia vegetal y de acuerdo con la literatura referencial de la *Kalanchoe pinnata* se optó por la identificación de taninos, flavonoides, terpenoides, saponinas, esteroides, alcaloides y glicósidos, tabla 6.

Tabla 6. Parámetros establecidos para la identificación de metabolitos presentes en *Kalanchoe pinnata*.

Fitoconstituyente	Ensayo	Observación
Taninos	2mL extracto + 2mL H ₂ O + 2-3 gotas FeCl ₃ (5%)	Precipitado Verde
Flavonoides	1mL extracto + 1mL Pb (CH ₃ -COO) ₂ (10%)	Coloración Amarilla
Terpenoides	2mL extracto + 2mL (CH ₃ CO) ₂ O + 2-3 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado	Coloración rojo intenso.
Saponinas	a) 5mL extracto + 5mL H ₂ O + calor	Formación de espuma.
	b) 5mL extracto + gotas de aceite de oliva.	Emulsión formada.
Esteroides	2mL extracto + 2mL CHCl ₃ + 2mL H ₂ SO ₄ concentrado	Anillo de color marrón– rojizo
Alcaloides	2 mL extracto + unas gotas del reactivo de Hager	Precipitado amarillo.
Glicósidos	2 mL extracto + 2 mL CHCl ₃ + 2 mL CH ₃ COOH	Coloración violeta, azul o verde

6.2 Metodología para la evaluación de las propiedades antioxidantes de *Kalanchoe pinnata*

6.2.1 Poder reductor de los antioxidantes

De acuerdo con Oyaizu¹³⁶ se estableció un método modificado para la evaluación del poder reductor del ion férrico (Fe^{3+}) en extractos de materia vegetal.

En un tubo eppendorff de 1500 μL se añadieron 100 μL de muestra (utilizando concentraciones de 40 hasta 80 $\mu\text{g/mL}$) homogenada en agua, 500 μL de un amortiguador de fosfatos (0.2 M, pH: 6.6) y 500 μL de Ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) al 1%. Se incubaron los tubos por 20 minutos a una temperatura de 50°C , una vez pasado el periodo de incubación se les añadió 400 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se llevó a centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm. En un tubo de ensaye de añadieron 1 mL del sobrenadante obtenido, 1 mL de agua y 0.2 mL de cloruro férrico (FeCl_3) al 1%. La absorbancia de las muestras se obtuvo por triplicado en un espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 70 nm. El incremento de esta absorbancia da a entender que existe un aumento en el poder reductor del extracto vegetal.

6.2.2 Actividad estabilizante del radical DPPH

Con la metodología propuesta por Ohinishi¹³⁷, se cuantificó la capacidad estabilizante de un extracto metanólico vegetal para estabilizar el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Se elaboró un extracto vegetal disuelto en metanol (MeOH) en diferentes concentraciones (5, 10, 20, 50, 70, 100, 120 $\mu\text{g/mL}$). Se tomaron 1.5 mL de cada extracto y se colocó en un tubo de ensaye junto con 0.5 mL de DPPH 0.1 mM disuelto en metanol. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Pasado el periodo de incubación se procedió a hacer la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 517 nm en un espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25). Como referencia de esta actividad se utilizó el ácido ascórbico con las mismas concentraciones que el extracto vegetal.

El porcentaje de capacidad máxima para captar radicales libres (DPPH) se calculó con la siguiente formula.

$$\% \text{CSRL} = \left[\frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs DPPH}} \right] \times 100$$

6.2.3 Contenido de fenoles totales

La cantidad de fenoles totales presentes en un extracto vegetal acuoso se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu y la metodología descrita por Singleton-Rossi.¹³⁸

1 mL de extracto con una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ se aforó en un matraz de 50 mL. 1 mL de esta nueva solución se añadió a un tubo de ensaye al cual se le adicionó 2.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu 1:1 y 2 mL de

carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5%. Se incubó por 10 minutos a una temperatura de 50°C para después tomar lectura de su absorbancia en un espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 760 nm, utilizando como referencia una curva de calibración de ácido gálico en concentraciones (0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$) y un blanco de reactivos.

El contenido fenólico total se expresa como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo (mg EAG/g).

6.2.4 Habilidad para descomponer peróxido de hidrógeno

De acuerdo con Ruch¹³⁹ se estableció la metodología para evaluar la capacidad para descomponer peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de un extracto acuso de materia vegetal.

En un tubo de ensaye se añade 3 mL de extracto acuoso a concentraciones (40, 50, 60, 70, 80 $\mu\text{g/mL}$) y se le adicionó 1.8 mL de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH: 7.4) con H_2O_2 (2 mM/L), se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se obtuvo la absorbancia mediante un espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 230 nm, utilizando un blanco de reactivos.

El porcentaje de esta actividad se calculó con la siguiente fórmula.

$$\% \text{CDP} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} \times 100$$

6.2.5 Barrido de radicales superóxido

Con la metodología propuesta por Beauchamp,¹⁴⁰ se determinó el barrido de radicales superóxidos ($\text{O}_2^\cdot$) de un extracto metanólico vegetal.

En un tubo de ensaye se añadió el volumen correspondiente a concentraciones de (5, 10, 15, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$) de una solución patrón y se añadió el volumen de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH: 7.4, al cual se le añadió 20 μg de riboflavina, EDTA 2mM y 0.1 mg de azul de nitrotetrazolio) para tener 1 mL de volumen final. Se expuso a luz durante 5 minutos y se obtuvo la absorbancia mediante un espectrómetro UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 590 nm, utilizando un estándar de ácido ascórbico con las mismas concentraciones.

6.3 Metodología para los grupos de ensayo biológicos

Se seleccionaron ratas Wistar con pesos entre 130 – 150 g. Se separaron por sexo y se establecieron grupos de 6 ratas cada uno (1. Control, 2. Expuesto a azúcar vía oral “azúcar”, 3. Expuestos al extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* “EKP”, 4. Expuesto a azúcar + extracto de *Kalanchoe pinnata* “azúcar-KP”). Se midió la glucosa en sangre cada 7 días y se realizó un examen general de orina al inicio, a los 30 días y a los 60 días de tratamiento. Pasado los 60 días de tratamiento se sacrificaron recolectando el hígado, el riñón y páncreas homogenizando los órganos con ayuda de un buffer a pH 7.4 para analizarlos mediante un equipo de espectrometría UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 25), con longitud de onda de 190 nm hasta los 1100 nm, y así determinar la actividad de las enzimas CAT, SOD, Cit-Cox, GST.

6.3.1 Examen general de orina (EGO)

El examen general de orina (EGO) está compuesto por varias pruebas que identifican diferentes analitos eliminados por el riñón; su resultado es de gran importancia en el estudio inicial de enfermedades de origen urinario o sistémico, esto hace necesario que sus datos sean correctamente interpretados ya que pueden ofrecer una información tan cercana como la que entrega una biopsia renal.

El análisis químico se realizó con tiras reactivas (ACON, Mission) y generó resultados en segundos; estas al tener contacto con las sustancias de la orina, producen reacciones químicas que son reflejadas en cambios en el color proporcionales a la concentración de las sustancias y expresadas en resultados cualitativos y semicuantitativos.¹⁴¹

- **pH.** El pH urinario varía de 4.5 a 8. Normalmente la orina es ligeramente ácida, oscilando su valor entre 5 a 6.5; este parámetro varía de acuerdo al equilibrio ácido base sanguíneo, a la función renal y en menor proporción a la dieta, a fármacos y al tiempo de exposición de la muestra. La orina es alcalina cuando su pH es mayor a 6.5, como sucede en dietas vegetarianas, ingesta de diuréticos, alcalosis respiratoria, vómito, acidosis tubular renal distal o tipo I y en aquellos casos donde la urea se convierta en amoníaco y aumente el pH (como sucede en las orinas procesadas tardíamente y en las infecciones por *Proteus spp*, productor de amoníaco gracias a la acción de la ureasa). Por otra parte, cuando la orina tiene un pH menor a 6 se considera ácida y se da por dietas hiperproteicas, ceto-acidosis diabética, infecciones por *E. Coli*, fiebre, acidosis respiratoria, aciduria por ácido mandélico y fosfórico, administración de fármacos como anfotericina B, espironolactona y Aines.
- **Leucocitos.** La prueba de esterasa leucocitaria se considera una medida indirecta para indicar la presencia en la orina de glóbulos blancos, principalmente granulocitos (neutrófilos y eosinófilos).

Estas células blancas intactas o lisadas son las únicas que contienen en su citoplasma una enzima llamada esterasa, la cual hidroliza el reactivo de la tirilla (ACON, Mission) haciéndola cambiar de color; de esta forma se determina la presencia de los leucocitos. Esta prueba en el estudio de la Incontinencia Urinaria (IU) tiene mejor sensibilidad que especificidad, sus falsos positivos se pueden presentar en orinas contaminadas por secreciones genitales, en balanitis (inflamación del prepucio y glande), vaginitis, fiebre, deshidratación, glomerulonefritis, nefrocalcinosis, tumores nefrourológicos, malformaciones del tracto urinario, trauma renal, nefritis intersticial por fármacos, entre otros.

- **Proteínas.** Normalmente no se deben reportar proteínas en la orina; su valor debe ser menor a 6 mg/dL. La tira reactiva tiene una sensibilidad y especificidad de 99% para detectar albúmina, pero es pobre para detectar globulinas, glucoproteínas, ribonucleasas, lisozimas y mucoproteínas. La deshidratación, la fiebre, la exposición prolongada al frío y la realización de ejercicios pueden generar trazas de proteínas en la orina clasificada como proteinuria transitoria, que por lo general remite en pocos días y no es patológica.
- **Glucosa.** Se detecta a través de la reacción de la glucosa oxidasa/peroxidasa. La lectura de glucosuria debe ser cero porque la glucosa filtrada es reabsorbida casi en su totalidad (99.9%) en el túbulo contorneado proximal y solo aparece en la orina cuando el valor de la glicemia supera el umbral renal tubular de reabsorción de glucosa estipulada entre 160-180mg/dL o cuando hay daño en el túbulo proximal renal. Por lo tanto, la glucosuria se puede presentar en dos escenarios, primero en cuadros hiperglucémicos con función tubular proximal normal, como sucede en la diabetes mellitus tipo 1 y en la sobre-infusión de sueros glucosados, y segundo en cuadros no hiperglucémicos con función tubular proximal alterada.
- **Cetonas.** Su lectura debe ser cero; la presencia de cetonuria está relacionada con alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos y de los carbohidratos. Los pacientes con ayuno prolongado, fiebre, vómito, diabetes mellitus tipo 1, algunos errores innatos del metabolismo y dietas ricas en proteínas pueden cursar con cetonuria. De los tres cuerpos cetónicos (ácido hidroxibutírico 78%, ácido acetoacético 20% y acetona 2%), solamente son detectados por la tira el ácido acetoacético y la acetona.
- **Urobilinógeno.** Es un pigmento biliar que se oxida fácilmente a temperatura ambiente; su valor está relacionado directamente a la presencia de bilirrubina indirecta y se encuentra normalmente en concentraciones bajas, alrededor de 1mg/dl e incluso su lectura puede ser menor o negativa. La presencia de urobilinógeno en la orina está asociada a patologías hepatocelulares como la hepatitis

y a entidades con hiperbilirrubinemia indirecta como las anemias hemolíticas; su existencia también puede significar o indicar daño temprano del parénquima hepático.

- **Bilirrubinas.** Su lectura es negativa. Cuando se presenta bilirrubina en la orina es conjugada o directa, ya que por ser hidrosoluble pasa el glomérulo renal, lo cual haría sospechar la presencia de obstrucción intra o extra-hepatobiliar como sucede en la ictericia obstructiva, en la enfermedad hepatocelular y en el cáncer del páncreas o de los conductos biliares. La bilirrubina indirecta, por no ser hidrosoluble, no pasa el glomérulo y por lo tanto su reporte es negativo; de esta forma, ciertas patologías presentes en pacientes pueden tener reportes negativos de bilirrubinas en orina. Existen falsos negativos por presencia de ácido ascórbico y cuando las orinas no son procesadas tempranamente ya que la luz solar puede alterar la estructura química de las bilirrubinas.
- **Sangre.** la tira reactiva no discrimina entre hematuria, hemoglobinuria y mioglobinuria porque todas catalizan la reacción de la peroxidasa, de ahí la importancia de realizar el análisis del sedimento urinario, proceso que es esencial para el diagnóstico de la hematuria. Los datos de la historia clínica, el estudio del sedimento urinario y los resultados de las pruebas específicas, como la del sulfato de amonio, pueden ayudar a establecer esta diferenciación. Si la tira reactiva es positiva para sangre, pero el examen microscópico no reporta presencia de hematíes se debe sospechar la existencia de hemoglobinuria o mioglobinuria.

6.3.2 Proteína C-reactiva (PCR) como indicador de procesos inflamatorios

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína presente normalmente en suero. Pero su concentración puede aumentar significativamente en infecciones bacterianas y virales, daño tisular, inflamación y neoplasias malignas, pudiendo llegar a ser el 2% de las proteínas del suero. La PCR, se detecta mediante una reacción inmunológica de aglutinación. El Reactivo látex-PCR posee anticuerpos específicos anti-PCR absorbidos sobre partículas inertes de látex. Mezclando de forma directa la muestra con el Reactivo látex, la presencia de PCR provoca la aglutinación de las partículas de látex, que se visualiza macroscópicamente.

Su determinación se llevará a cabo de la siguiente manera.

Se colocó una muestra de suero en un portaobjetos de vidrio para pruebas de aglutinación, posteriormente se añadió 1 gota de reactivo látex-PCR, se mezcló por 2 minutos con ayuda de un aplicador y se analizó mediante un estereoscopio de fondo negro. Los resultados obtenidos fueron comparados con los controles proporcionados por el kit comercial de análisis clínicos (Bio-PCR).

6.3.3 Determinación de proteína total por el método de Lowry

La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó empleando el método colorimétrico de Lowry, modificado por Peterson en 1977. El principio del método se basa en que ciertos aminoácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molíbdico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría entre 600 y 900 nm (con una absorbancia máxima a 740 nm).

Esta coloración es reforzada por el acomplejamiento de sulfato de cobre con los enlaces peptídicos de las proteínas. La intensidad de la coloración obtenida depende del número y de la naturaleza de los residuos que constituyen la proteína presente en la muestra a analizar ya que a iguales concentraciones dos proteínas diferentes no desarrollan la misma intensidad de color. La figura 16 muestra la reacción que se lleva a cabo. Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer.¹⁴²

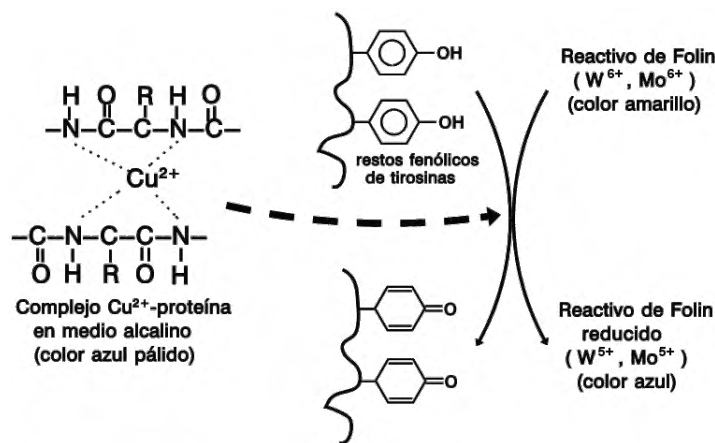


Figura 16. Esquema del proceso de obtención de proteínas mediante la técnica de Lowry (Lowry, 1951).

Este método consta de dos etapas:

- i. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} , se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

- ii. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

La metodología utilizada para los ensayos bioquímicos fue la siguiente.

En un tubo se ensaye se colocaron 790 μL de agua destilada junto con 10 μL de la muestra, 100 μL de desoxicolato de sodio, 2 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%, 2 g de NaOH y 0.134 g de Tartrato de sodio potasio.

Posteriormente se hizo una dilución 1:3 del reactivo de Folin-Ciocalteu y a se añadieron 100 μL al tubo de ensaye ya preparado. Una vez preparado el tubo de ensaye se agitó vigorosamente dejándolo en reposo por un tiempo de 15 minutos para posteriormente leerlo en un espectrómetro de Ultravioleta-Visible (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 750 nm. Utilizando una curva patrón de albumina sérica.

6.3.4 Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son producidas como una consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico normal. La cadena de transporte de electrones de la mitocondria, los peroxisomas, la NADPH oxidasa, el óxido nítrico sintetasa desacoplada y el sistema del citocromo P450 son las fuentes más importantes de producción de los EROS. El desbalance entre la producción de los EROS y el sistema de defensa antioxidante en los sistemas vivos ocasiona una ruptura de la función celular y daño. Este desbalance ocurre por una sobreproducción de EROS y una reducción del mecanismo de defensa antioxidante. Las acciones protectoras contra los EROS son llevadas a cabo por varias enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y también por compuestos no enzimáticos (vitamina E, ascorbato, glutatión, transferrina, ceruloplasmina, etc.). Las EROs son moduladores cruciales de las funciones celulares. A bajas concentraciones, las EROs son participantes esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica, la defensa contra agentes infecciosos, mientras que el exceso de los EROS puede alterar la función celular normal y promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares.

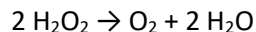
El principio de su medición se basa en la interacción que tiene que ácido tiobabitéurico con el malondialdehído, obteniendo un color susceptible de ser medido directamente.

La metodología empleada para los ensayos bioquímicos fue la siguiente.

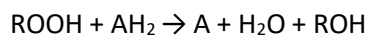
En un tubo eppendorf de 1500 μL de capacidad se añadieron 0.2 mL de homogenizado, se completó 1 mL con amortiguador PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos) 0.1 M con un pH igual a 7.4. Para que la reacción mencionada anteriormente se lleve a cabo se añadieron 0.025 mL de butilrihidroxitolueno y 300 μL de ácido tricloroacético al 30%. Se agitaron los tubos y se dejaron reposar en hielo por un periodo de 2 h para después centrifugarse a 2000 rpm por 15 min pasado este tiempo, se tomó 1 mL de la fase líquida formada se llevó a un tubo de ensaye limpio para añadirle 0.075 μL de EDTA al 0.1 M y 0.25 μL de ácido tiobarbitúrico. Finalmente, se agitaron los tubos y mediante baño maría se llevaron a punto de ebullición durante 15 min. Pasado este tiempo se analizaron las muestras en un espectrómetro Ultravioleta-Visible (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 532 y 600 nm, respectivamente. Una vez obtenidos los datos de la absorbancia se procedió a calcular la concentración presente de esta especie mediante la ley de Lambert-Beer ($A = c \epsilon l$).

6.3.5 Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima que se clasifica como antioxidante ya que constituye el principal mecanismo de defensa frente al daño oxidativo *in vivo*. Cataliza la reacción de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a oxígeno y a las moléculas de agua.



Además de que posee actividad peroxidativa, donde alcoholes como el metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles pueden servir como donadores de electrones.¹⁴³



La metodología empleada para la medición de la actividad fue la siguiente.

En una celda de 3 mL se añadió el volumen correspondiente para 1 mg/mL de proteína, calculada con los datos obtenidos de la concentración de proteína total por el método de Lowry, se añadió el volumen necesario para completar los 3 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M con pH 7.4 al cual se le colocó H_2O_2 50 mM. Posteriormente se analizó en un espectrómetro Ultravioleta-Visible (Perkin Elmer, Lambda 25) a una longitud de onda de 240 nm, calculando su actividad con el método de Lambert-Beer.

6.3.6 Actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD)

Dentro del sistema de defensa enzimático se encuentran enzimas como superóxido dismutasa (SOD), la cual pertenece a una familia de metaloenzimas que catalizan la conversión del $\text{O}_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y a O_2 . Para su determinación se empleará la siguiente metodología.

Se realizó el homogenizado en un amortiguador de fosfatos (PBS) 50 mM a pH de 7.8, junto con 13 mM de metionina, 75 μ M de nitrito azul de tetrazolio, 100 μ M de EDTA y 2 mM de riboflavina. Para que la reacción se lleve a cabo se añadieron 100 μ L de riboflavina al amortiguador de PBS.

La medición se llevó a cabo en un espectrómetro Ultravioleta-Visible (Perkin Elmer, Lambda 25), utilizando celdas de vidrio, a las cuales se les añadió 3 mL de amortiguador y el volumen correspondiente a 1 mg/mL de homogenizado renal, hepático y pancreático preparado anteriormente. La absorbancia se medirá en diferentes tiempos.

Longitud (nm)	Tiempo (min)
560	0
560	5
560	10

Después de la primera lectura, la muestra se expuso a la luz natural por un periodo de tiempo de 10 min (teniendo una lectura en un intervalo de tiempo a los 5 min), el cual es tiempo en el que el azul de nitro-tetrazolio reacciona con la proteína, debido a que actúa como receptor de electrones y como ocurre una reducción este tiende a cambiar a una coloración rojiza. Pasado este tiempo, se prosiguió a realizar una lectura en el espectrofotómetro. La concentración de esta enzima se determinó mediante la ley de Lambert-Beer ($A=c \epsilon l$).

6.3.7 Actividad de la Citocromo-C oxidasa (Cit-Cox)

Los citocromos son proteínas que poseen un grupo prostético hemo. Durante el transporte de electrones, el átomo de hierro de los citocromos alterna entre un estado reducido (+2) y un oxidado (+3). El grupo hemo transfiere un solo electrón, la coenzima Q reducida debe transferir sus 2 electrones a 2 moléculas de citocromo b.¹⁴⁴ La enzima citocromo oxidasa de la cadena respiratoria cataliza la oxidación del citocromo c.

Debido a que los sistemas antioxidantes que disponen los seres vivos no son 100% eficientes, las células se van dañando de forma progresiva y con ello pierden funciones fisiológicas. En la mitocondria este daño disminuye la capacidad de producción de energía (disminuyendo su capacidad de regeneración) y por otro incrementa la fuga de electrones (que a su vez incrementa el daño oxidativo).¹⁴⁵

La medición de su actividad se llevó a cabo de la siguiente manera.

Se homogenizaron en frío de 2 – 5 gramos de hígado, riñón y páncreas por separado, añadiendo 9 veces su volumen de cloruro de potasio 0.15 M por cada gramo de órgano. Seguido de esto se midió la concentración

de proteína total por el método de Lowry. Posteriormente se calculó el volumen necesario para tener la concentración de 1 mg/mL. En una celda de vidrio de 3 mL se agregaron 0.5 mL de α -naftol 0.15% en EtOH al 10%, 0.5 mL de dimetil-*p*-fenilendiamina al 0.15%, el volumen determinado por la metodología de Lowry del homogenizado con la concentración de 1 mg/mL de proteína total y finalmente el volumen necesario de agua para completar los 3 mL totales de la celda. Se colocó en un espectrómetro UV-Visible (Perkin Elmer, Lambda 25) y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm, en un periodo de tiempo total de 5 min cada 20 segundos.¹⁴⁶

6.3.8 Actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa (GST)

Las glutación-S-transferasas constituyen una superfamilia de isoenzimas multifuncionales que participan en la detoxificación celular de una serie de compuestos electrofílicos que incluyen las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y de los productos generados durante el daño celular, tales como lipoperóxidos. Esta detoxificación se realiza principalmente a través de la conjugación de glutación con xenobióticos y/o endobióticos, convirtiéndolos en compuestos más solubles capaces de ser eliminados por el organismo.¹⁴⁷

Para su determinación se utilizó un homogenizado de cada órgano con un amortiguador de fosfatos (PBS) (pH: 7.4). Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas presente en cada muestra mediante la técnica de Lowry. Para analizar la muestra en el espectrofotómetro de Ultravioleta-Visible (Perkin Elmer, lambda 25) con una longitud de onda a 350 nm, se utilizó una celda de vidrio, la cual incluirá un volumen correspondiente de un amortiguador de PBS 0.1 M y pH de 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno a una concentración final de 1 mM y el ligante glutación reducido a una concentración final de 1 mM la mezcla se homogenizó por inversión y se añadió un volumen correspondiente de 1mg/mL de proteína. La concentración obtenida de esta enzima se calculó mediante la ley de Lambert-Beer ($A = c \varepsilon l$). La medición se llevó a cabo en intervalos de 20 segundos y se utilizó un coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$.

6.4 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar. Las diferencias generales entre los grupos de tratamiento se compararon mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La metodología del Minitab, Versión 2017, se utilizó para todos los análisis estadísticos.

Capítulo 7: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de fitoconstituyentes y evaluación de la actividad antioxidante de *Kalanchoe pinnata*

7.1.1 Material vegetal

En Texcoco el clima es templado y en Tuxtepec, Oaxaca cálido-húmedo. Esto provocó que la adaptación de la planta al clima modificara el crecimiento y el contenido de metabolitos de la misma. En Texcoco, la planta no crece tanto como se ha reportado en la bibliografía, sin embargo, en Tuxtepec, creció desarrollando tallos largos y delgados, así como flores de color rosa en forma de racimos de campanillas. De la misma forma se ha observado que los brotes pueden crecer en condiciones de hidroponía, en ausencia de tierra. Las imágenes siguientes de la figura 17 muestran las características mencionadas y se tomaron siguiendo el crecimiento de los brotes que se plantaron en Tuxtepec, Oaxaca.



Figura 17. Características físicas de *Kalanchoe pinnata* en diferentes condiciones de crecimiento. A) Crecida sola en maceta. B) Hijuelos juntos de KP en maceta. C) Presencia de flores de KP. D) Hijuelos juntos de KP en ausencia de tierra (Gerardo-Agosto; Navarro-Moreno, 2023).

7.1.2 Extracción y estudios fitoquímicos

Una vez obtenidos los extractos se realizó una comparación visual de los métodos Extracción Rápida con Agua Caliente Presurizada (ERACP) y Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU). Para EAU se realizaron 3 ciclos de 10 minutos cada uno mientras que para ERACP solo uno, debido a que el agua caliente presurizada daña el material vegetal dejándolo casi inservible. En la figura 18, se observan los extractos obtenidos por ERACP (A) y las tres fracciones obtenidas por EAU (B) en cada ciclo. También se observa que, a medida que fueron aumentando los ciclos de EAU el extracto aumentó de color, posiblemente debido a la alta concentración de metabolitos obtenidos.

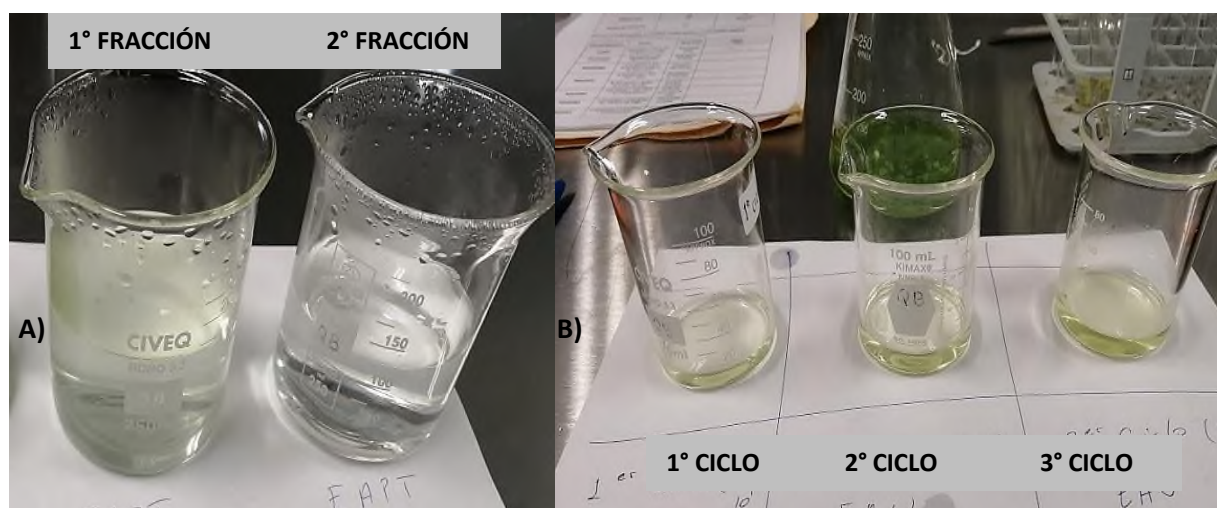


Figura 18. Extractos obtenidos mediante: A) Extracción Rápida con Agua Caliente Presurizada (ERACP) y B) Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) (Gerardo-Agosto, 2020).

Los resultados anteriores pueden deberse al fenómeno de cavitación ocasionado por la interacción de las ondas generadas en el baño ultrasónico con el material vegetal. Aunque el método ERACP es más rápido no se compara con la eficiencia de EAU ya que la materia vegetal se ve afectada por el agua caliente haciendo que esta quede inservible además que el tiempo de interacción entre el disolvente y la materia es mínimo. Por su parte la EAU es más viable para este tipo de investigación porque no generó daño a la materia vegetal, haciendo que se pueda reutilizar para ciclos posteriores y que haya un mayor tiempo de interacción entre el sistema ultrasónico y la materia en cuestión. Esto provoca que, como ya se mencionó anteriormente, el fenómeno de cavitación aumente la concentración de metabolitos presentes en el disolvente.

Algunas técnicas de extracción como la maceración, la extracción con fluidos supercríticos, extracción alcalina, entre otros, pueden generar pérdida de metabolitos de interés en la materia vegetal a analizar ya que se utilizan altas temperaturas, tiempos muy prolongados o reactivos que desnaturalizan los metabolitos

de las plantas. Es por ello que en esta investigación se optó por utilizar dos tipos de extracciones mencionadas anteriormente.

Las ventajas al utilizar EAU son: aumento de la eficiencia; reducción del tiempo de extracción y disminución del volumen de disolventes usados, así como el consumo de energía.^{148, 149} Este procedimiento consta de dos etapas: 1) remojado el material vegetal en el disolvente para facilitar los procesos de hinchamiento y deshidratación: 2) la transferencia de masa de los fitoconstituyentes solubles de la materia vegetal al disolvente por difusión y procesos osmóticos. Es así como el ultrasonido puede facilitar la hinchazón y la hidratación y, por lo tanto, causar agrandamiento en los poros de la pared celular, mejorando el proceso de difusión y transferencia de masa.¹⁵⁰ Se han descrito diferentes mecanismos que pueden ser activados por el ultrasonido de alta densidad (20 – 100 KHz), tales como el calentamiento, turbulencia, agitación, fricción, inestabilidad superficial y otros. Aunque no todos están bien estudiados, la mayoría de ellos se pueden atribuir a un fenómeno no lineal muy complejo conocido como cavitación. Se sabe que cuando la potencia de ultrasonido aumenta, se presentan cambios químicos y físicos en el medio líquido por la generación y posterior destrucción de burbujas de cavitación. Cuando un líquido se somete a un ultrasonido con suficiente potencia, el líquido se comprime y se expande, formando pequeñas burbujas o cavidades (fig. 19)¹⁵¹ estas burbujas crecen y se encogen con ciclos de expansión y compresión de la onda ultrasónica, cuando alcanzan un tamaño crítico estas éstas explotan. El colapso de estas burbujas puede ser tan violento que puede causar daños considerables al medio circundante.¹⁵²

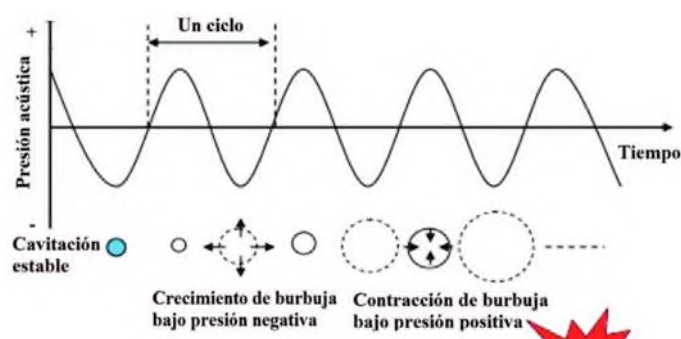


Figura 19. Fenómeno de cavitación.

Por otro lado, la técnica de ERACP tiene una similitud con la extracción de Soxhlet, el cual es un método de extracción sólido-líquido. ERACP tiene como objetivo realizar un aislamiento a pequeña escala utilizando el material vegetal triturado o cortado en pedazos pequeños, esto con el fin de que los disolventes tengan mayor interacción con el área superficial de la planta y que con esto faciliten la extracción de los metabolitos. Otra

de las ventajas dentro de esta técnica es que se utiliza como reactor una cafetera convencional de café expés y como disolvente se utiliza al agua, ya que su punto de ebullición es de 100°C y el reactor alcanza una temperatura por arriba a la establecida anteriormente. Se debe tener en cuenta que el volumen del disolvente se verá afectado por la temperatura alcanzada del reactor, dando como resultado una disminución aproximada de 7.5% del volumen inicial.¹⁵³ El sistema utilizado tuvo las siguientes condiciones fisicoquímicas: temperatura máxima 100 °C, presión de 1 Atm; tiempo de operación aproximado de tres minutos y un filtro metálico.

7.1.3 Estudio fitoquímico

La evaluación fitoquímica cualitativa se realizó en el laboratorio de Productos Naturales, perteneciente a la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, con el asesoramiento del Dr. Omar Viñas Bravo.

De los extractos obtenidos, se utilizó la primera fracción recolectada de ERACP y la fracción correspondiente al 3° ciclo de EAU. Se optó por estas dos fracciones, ya que, en el caso de ERACP, la primera fracción tuvo una coloración más intensa en comparación con la segunda fracción. Algo similar ocurrió para la tercera fracción de EAU, que obtuvo una coloración mayor a diferencia de las dos primeras. Con ambas fracciones se llevó a cabo la detección de los constituyentes fitoquímicos de las hojas de la planta.

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos de las pruebas químicas en las hojas de *Kalanchoe pinnata* para detectar los fitoconstituyentes presentes en ambos extractos. Los ensayos se basaron en el trabajo de Yadav *et al.*¹²³ utilizando la siguiente simbología: (+++) muy positivo, (++) positivo, (+) poco positivo y (-) para pruebas negativas.

Tabla 7. Fitoconstituyentes de las hojas de *Kalanchoe pinnata* ERACP y EAU.

Fitoconstituyentes	Observaciones	ERACP	EAU
Taninos	Precipitado verde.	-	+
Flavonoides	Coloración amarilla.	-	++
Terpenoides	Coloración rojo intenso.	-	-
Saponinas	Formación de espuma.	-	-
	Emulsión formada.	-	-
Esteroides	Anillo de color marrón-rojizo.	-	++
Alcaloides	Precipitado amarillo.	-	-
Glicósidos	Coloración violeta, azul o verde.	-	-

Al realizar las pruebas para taninos en el extracto EAU, el resultado obtenido era dudoso. Para verificar dicho resultado, se procedió a realizar una comparación con ácido tánico. Al observar las similitudes al momento

de agregar el cloruro de hierro III (FeCl_3) en el extracto puro, se concluyó que sí había presencia de taninos en la muestra obtenida por EAU.

De igual manera que los taninos, los flavonoides daban un resultado dudoso, sin embargo, al momento de hacer una comprobación al agregar las gotas de acetato de plomo, se observó el cambio de coloración esperado seguido de un precipitado de color blanco. El resultado se muestra en la figura 20.

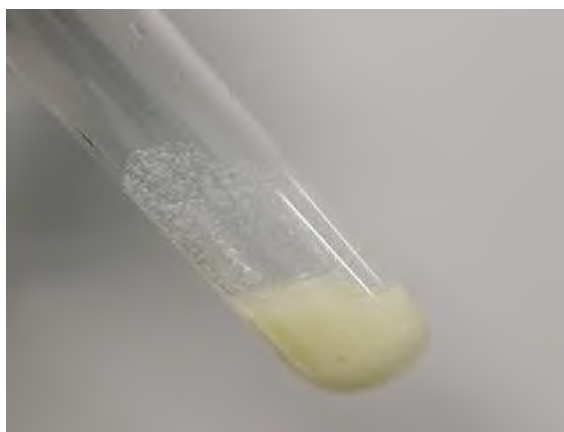


Figura 20. Identificación de flavonoides en muestras por EAU (Gerardo-Agosto, 2020).

7.1.4 Cromatografía en capa fina

Como método de comprobación de los resultados obtenidos en la sección anterior se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina para las muestras obtenidas por EAU, tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) Se utilizaron 200g de material vegetal.
- b) Se realizaron 3 ciclos de baño ultrasónico con un tiempo de 10 minutos cada ciclo y un tiempo de descanso de 10 segundos.
- c) Se utilizó una solución agua-etanol 1:1.

El extracto obtenido en esta ocasión se introdujo en un matraz bola de 250 mL, el cual se colocó en un rotavapor para eliminar el exceso de solventes. Pasado 30 minutos gran parte del etanol (EtOH) se había evaporado y el agua también comenzó a evaporarse. Por lo anterior, se omitió el paso de la extracción con *n*-butanol y se procedió a tomar la muestra directamente del residuo presente para realizar las cromatografías en capa fina (CFF).

En la figura 19, se muestran las placas cromatográficas donde se observan los compuestos presentes en el extracto obtenido. Para su visualización se usaron los siguientes reveladores: Lámpara de UV de 365 y 254

nm, FeCl_3 , KMnO_4 y calcinación con H_2SO_4 al 50%, siendo estos dos últimos considerados como reveladores universales ya que, en el caso de H_2SO_4 , permite ver un amplio número de compuestos no volátiles, y en el caso de KMnO_4 se observan compuestos que tienen en su estructura grupos que se oxidan como son los alcoholes, alquenos, alquinos, entre otros.

Al revelar las placas cromatografías se observó que cuando el sistema de elución empleado fue el Hexano: Acetato de etilo (4:1) y las placas se revelaron con luz ultravioleta se detectó una banda de arrastre por muestra. Al utilizar la calcinación y el revelado con KMnO_4 , H_2SO_4 y FeCl_3 , solo en el caso del ácido sulfúrico se pudieron detectar las mismas bandas. Al usar FeCl_3 las bandas fueron muy tenues y en el caso del permanganato de potasio el resultado fue negativo. Sin embargo, la información que proporciona la CCF no es utilizada para proponer estructuras químicas, sino para observar la existencia o no de bandas de corrimiento y separación de compuestos. Esto podría indicar que los compuestos visualizados por esta técnica son afines a los solventes orgánicos no polares y resistentes al ácido sulfhídrico. También puede explicar el por qué en la fase acuosa polar del sistema ERACP no se obtuvieron metabolitos.

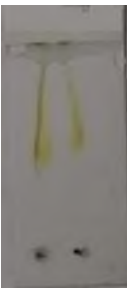
SISTEMA	UV: 254 nm	UV: 254 NM	UV: 365 nm
Hexano:Acetato de etilo (4:1)			
Calcinación			
	KMnO_4	H_2SO_4	FeCl_3

Figura 21. Placas cromatografías del extracto obtenido por EAU. Se emplearon reveladores de KMnO_4 , H_2SO_4 , FeCl_3 y una lámpara de UV con longitudes de onda de 365 y 254 nm (Gerardo-Agosto, 2020).

Se sabe que la cromatografía en capa fina especialmente se utiliza para determinar el número de compuestos presentes en una mezcla, establecer si dos o más compuestos son idénticos o no y para seguir el curso de una reacción. Las placas cromatográficas están cubiertas comúnmente gel de sílice (partículas de SiO_2) finamente molidas, que sirven como fase estacionaria. Para la fase móvil se utiliza un disolvente puro o una mezcla de disolventes cuya composición apropiada de la fase móvil depende de las polaridades de los compuestos en la mezcla que se estén separando. Una vez aplicada la muestra en la capa, se introduce en una cámara saturada de la fase móvil, en donde el disolvente se eleva a través de la fase estacionaria por el fenómeno de capilaridad, a medida que el disolvente asciende por la placa, la muestra se distribuye en la fase móvil y estacionaria. Cuanto más se une un compuesto al adsorbente más lentamente se mueve en la placa. Una vez realizado este paso, la placa se retira y se marca inmediatamente la posición del frente del disolvente antes que el disolvente se evapore y se seca la placa para poder ser revelada. De esta forma se obtiene la información. Debido a los resultados obtenidos por cromatografía en placa fina, se estableció una nueva metodología para verificar los compuestos presentes en *Kalanchoe pinnata*, en la cual se disminuyó la polaridad del sistema de solventes, con el fin de extraer la mayor cantidad posible de metabolitos presentes.

7.1.5 EAU con un sistema de disolvente de hexano al 100%

La metodología consistió en la recolecta de la materia vegetal junto con el lavado y desinfección, y la reducción del tamaño de los cortes de las hojas bajo los criterios de la sección. Posterior a ello, se realizó una EAU con un sistema de disolvente de hexano al 100%; se filtró el contenido y se obtuvo el primer extracto. A la materia vegetal restante se le aplicó otra EAU con un sistema de solventes agua-etanol 1:1; se filtró y se obtuvo el segundo extracto. A ambos extractos se les realizaron las pruebas químicas y CFF indicadas anteriormente (sección 7.4).

Cuando se recolectó el extracto obtenido con el sistema hexano 100% se observó la presencia de dos fases (orgánica y acuosa, Fig. 23), esto debido a que *Kalanchoe pinnata* pertenece a la familia de las *Crassulaceae*, la cual se caracteriza por la acumulación de agua dentro de ellas, con el fin de formar una alternativa de sobrevivencia.¹⁵⁴ La división de fases fue ocasionada porque el hexano no es miscible en agua ya que es un solvente no polar (fase orgánica, figura 20-A).

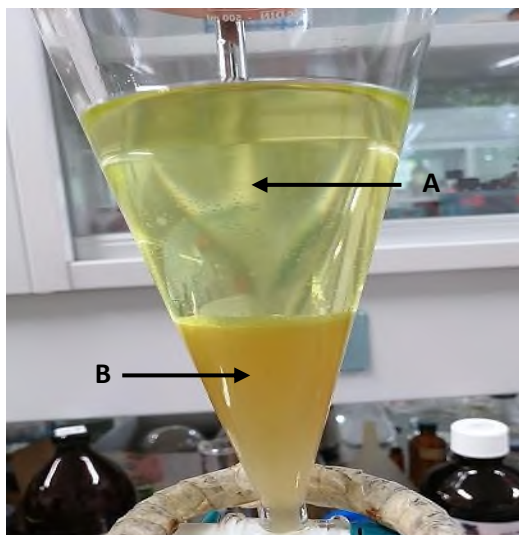


Figura 22. Presencia de dos fases en el extracto obtenido con un sistema de hexano 100%, donde A) corresponde a la fase orgánica y B) a la fase acuosa (Gerardo-Agosto, 2020).

Para la identificación de taninos y flavonoides se utilizó la fase acuosa (Figura 20-B), mientras que para las demás pruebas se utilizó la fase orgánica de la extracción con hexano y el extracto obtenido con agua-etanol. La tabla 8 muestra los resultados generales.

Tabla 8. Compuestos determinados en hojas de *Kalanchoe pinnata* mediante Extracción Asistida por Ultrasonido, empleando diferentes sistemas de disolventes (simbología: (+++) muy positivo, (++) positivo, (+) poco positivo y (-) para pruebas negativas).

Fitoconstituyentes	Observaciones	EAU
Taninos	Precipitado verde.	-
Flavonoides	Coloración amarilla.	-
Terpenoides	Coloración rojo intenso.	++
Esteroides	Anillo de color marrón-rojizo.	+++
Alcaloides	Precipitado amarillo.	-
Glicósidos	Coloración violeta, azul o verde.	++

La figura 23 muestra los resultados visuales y los cambios presentes en los extractos obtenidos.

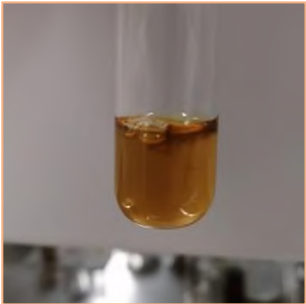
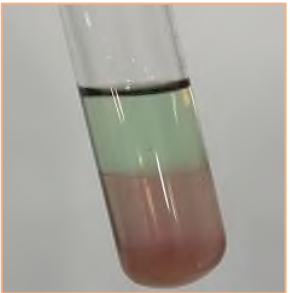
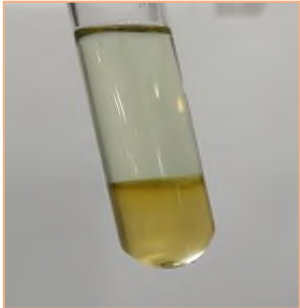
Metabolito:	Taninos	Flavonoides
Imagen:		
Extracto:	Fase acuosa del extracto con hexano 100%	Fase acuosa del extracto con hexano 100%
Metabolito:	Terpenoides	Glicósidos
Imagen:		
Extracto	Fase orgánica del extracto con hexano 100%	Fase orgánica del extracto con hexano 100%
Metabolito:	Esteroides	
Imagen:		
Extracto	Extracto con agua-etanol 1:1	

Figura 23. Pruebas químicas en los extractos obtenidos con diferentes sistemas de disolventes para la determinación de fitoconstituyentes presentes en *Kalanchoe pinnata* (Gerardo-Agosto, 2020).

De acuerdo con Yadav, y analizando los resultados obtenidos, en los extractos se identificaron tres grupos de metabolitos: terpenoides, esteroides y glicósidos.

Como siguiente paso se realizó la CCF de los extractos tres sistemas de fases móviles diferentes, las cuales se conformaron por:

- Hexano: Acetato de etilo 4:1
- Hexano: Acetato de etilo 7:3
- MeOH:CH₂Cl₂ 1:4

Las placas analizadas mostraron separaciones de bandas en las placas tratadas con el sistema Hexano: acetato de etilo. De ellas, las placas en donde se usó la mezcla 7 a 3 fueron en la que se separaron más. En el caso del sistema metanol: cloroformo se observó un barrido sin separación de las bandas.

En la figura 24, se observa A) la primera placa analizada en una lámpara UV, con una longitud de onda de 365 nm. Esta placa corresponde a la fase orgánica de la EAU con hexano, en donde se aplicó la misma muestra dos veces, esto dio como resultado la presencia de un compuesto abundante que fue revelado con el sistema hexano: acetato de etilo 4:1. B) Para la segunda placa se utilizó el mismo concentrado de la fase orgánica, pero se cambió la composición de la mezcla hexano: acetato de etilo (7:3). En este caso, se observaron 4 compuestos diferentes en una longitud de onda de 264 nm y 4 metabolitos presentes en 365 nm. C) Para la tercera placa, se utilizó el concentrado de la extracción agua-etanol, empleando un sistema MeOH: CH₂Cl₂ 1:4, el concentrado se aplicó por duplicado. La placa fue expuesta a las dos longitudes de onda. La misma placa se sometió a una longitud de onda a 254 nm, revelando un compuesto diferente el cual se posicionó en la parte superior del punto con mayor intensidad.

Tabla 9. Compuestos fitoquímicos determinados por Extracción Asistida por Ultrasonido usando dos sistemas diferentes.

Fitoconstituyentes	EAU con el sistema Agua:metanol	EAU con el sistema Hexano:acetato de etilo
Taninos	+	-
Flavonoides	++	-
Terpenoides	-	++
Saponinas	-	-
Esteroides	++	+++
Alcaloides	-	-
Glicósidos	-	++

De acuerdo con los sistemas de extracción utilizados (ERACP y EAU), se puede proponer que los constituyentes encontrados en los extractos de *K. pinnata* fueron taninos, flavonoides, terpenoides, esteroides y glicósidos en las muestras obtenidas por EAU.

Sistema de elución	UV: 365 nm	UV: 264 nm
A) Fase orgánica del extracto con hexano 100%. Sistema: Hexano: Acetato de etilo 4:1		
B) Fase orgánica del extracto con hexano 100%. Sistema: Hexano: Acetato de etilo 7:3		
C) Concentrado de la extracción: agua-etanol 1:1 Sistema: MeOH:CH ₂ Cl ₂ 1:4		

Figura 24. CFF de los extractos obtenidos en la fase orgánica de una extracción hexano 100% y del concentrado de la extracción agua-etanol 1:1, utilizando una lámpara de UV con longitudes de onda de 365 nm y 264 nm, y diferentes sistemas de fases móviles (Gerardo-Agosto, 2020).

Al comparar los resultados obtenidos usando los diferentes sistemas de corrimiento en hojas de extractos obtenidos por EAU, se puede proponer que existieron diferencias en función de la polaridad de los compuestos utilizados para correr las placas de cromatografía en placa fina (tabla 9).

Autores como Akihisa,¹¹³ Yamagishi¹¹⁴ y Quazi¹⁵⁵ han reportado que las propiedades de las hojas de KP varían dependiendo la zona geográfica en donde es cultivada y han demostrado que las hojas de la mala madre contienen esteroides, alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos; macro elementos; como el magnesio, calcio, potasio, fosforo y sodio; microelementos como el hierro y zinc y vitaminas como el ácido ascórbico, riboflavina tiamina y niacina^{8,156}. Las hojas de la planta cultivada en el municipio de Tuxtepec, Oaxaca presentaron taninos, flavonoides, esteroides, terpenoides y glicósidos, sin embargo, los demás compuestos no fueron detectados en las hojas que fueron analizadas. Lo anterior indica que las determinaciones de metabolitos con propiedades antioxidantes fueron parecidas a las reportadas por otros autores. La estructura química de los metabolitos secundarios en las plantas es diversa, pero en la actualidad se ha logrado clasificar en grupos químicamente análogos. Uno de estos es el relacionado con los compuestos fenólicos que abarcan a flavonoides, taninos, cumarinas, compuestos con estructura terpenoide, compuestos nitrogenados, y compuestos azufrados. El grado de solubilidad de estos compuestos ha sido de gran ayuda para complementar su clasificación, por ejemplo, los compuestos solubles en agua son los ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides y quinonas, mientras que los insolubles en agua son taninos condensados, ligninas y ácidos hidroxicinámicos, los cuales están unidos a la pared celular de las células vegetales.¹⁵⁷

El alto contenido de compuestos fenólicos particularmente de flavonoides, ha correlacionado positivamente con la capacidad de ciertas plantas para eliminar radicales libres e inhibir enzimas prooxidantes.¹⁵⁸ Se ha reportado que los compuestos fenólicos inhiben las LPL, mientras que estudios epidemiológicos han sugerido que su ingesta se asocia con enfermedades resultantes del estrés oxidativo. Esto se puede demostrar con la característica antioxidante de los metabolitos, ya que se ha demostrado *in vitro* que estos compuestos fenólicos disminuyen los niveles de EROs y ERNs mediante un mecanismo donde atrapan y disipan los electrones libres de los radicales libres mediante la donación de H⁺ generándose como consecuencia la formación de un radical fenoxilo menos dañino para las células.¹⁵⁹⁻¹⁶² Sin embargo, se ha demostrado que diversos parámetros pueden influenciar de manera negativa la capacidad antioxidante de estos compuestos, como cambios en su estructura mediante una sulfatación o glucuronidación.

7.2 Evaluación de la actividad antioxidante

Una vez comprobada la presencia de metabolitos con propiedades antioxidantes, en las hojas de *Kalanchoe pinnata*, la siguiente etapa consistió en la evaluación de las propiedades antioxidantes del extracto acuoso crudo de las hojas de la planta.

7.2.1 Poder reductor

En la figura 23, se muestran los resultados obtenidos, representados por una gráfica de absorbancia vs concentraciones del extracto orgánico. Se observó que a medida que aumentó la concentración de 40 a 60 $\mu\text{g/mL}$ de extracto crudo, la capacidad reductora fue aumentando, sin embargo, al incrementar la concentración de extracto más de 60 mg/mL la capacidad disminuyó.

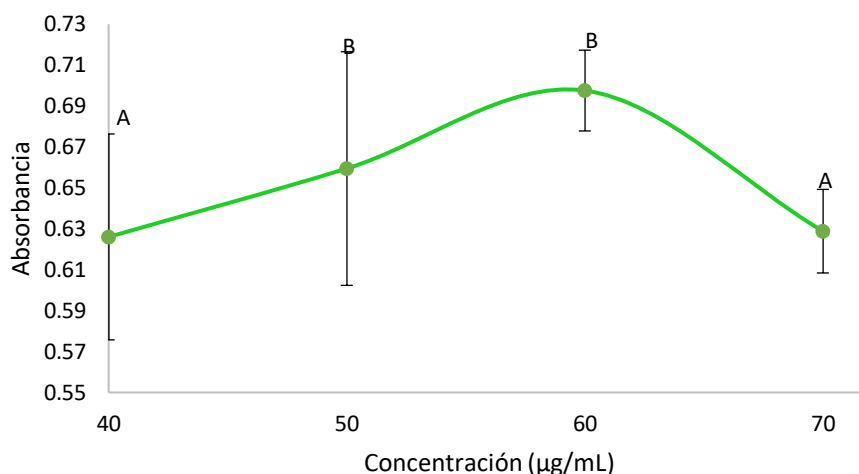


Figura 25. Poder reductor de un extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata*. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de las absorbancias y las concentraciones, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

El poder reductor se determinó por el método de Oyaizu. Este se basa en la capacidad de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . De acuerdo con la literatura, entre mayor sea la absorbancia de las diferentes concentraciones, superior será la capacidad del extracto de reducir los iones de hierro. Lo anterior se debe a la formación de un complejo coloreado por una reacción de tipo Fenton. La importancia del poder reductor radica en la protección contra el estrés oxidativo, el cual se produce cuando hay un desequilibrio entre las EROs y la capacidad del organismo para neutralizarlo. En este sentido, las moléculas con alto poder reductor, como los antioxidantes endógenos (glutación, superóxido dismutasa, catalasa, entre otros) y los antioxidantes exógenos provenientes de la dieta (vitamina C, vitamina E, polifenoles, etc.), pueden donar electrones a las especies reactivas de oxígeno, reduciéndolas y evitando así su daño a las células y tejidos.⁸⁰ Metabólicamente, el poder reductor está relacionado con la capacidad de una molécula para actuar como agente reductor, es decir, para transferir electrones a otras moléculas. Esta transferencia de electrones es esencial para el funcionamiento adecuado de muchas vías metabólicas, como la respiración celular y la producción de energía en forma de ATP. En el contexto de la respiración celular, el poder reductor se manifiesta a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial. En este proceso, las

moléculas con alto poder reductor, como el NADH y el FADH₂, donan electrones a las proteínas de la cadena de transporte de electrones, lo que genera un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP.¹⁶³

7.2.2 Actividad antirradical DPPH

La tabla 10 y la figura 26, muestran la capacidad estabilizante de radicales libres (RL) del extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* usando como referencia al ácido ascórbico. Los resultados indicaron que el extracto de la planta presentó, en promedio, 20 unidades menos de que el ácido ascórbico. Ambas muestras, mostraron una capacidad mayor al 50% evidenciando un alto potencial antioxidante.

Tabla 10. Porcentaje obtenido de la actividad estabilizante de radicales libres con el extracto de las hojas de *Kalanchoe pinnata*, usando como referencia ácido ascórbico. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3), que no comparten una letra son significativamente diferentes ^Ap $\leq$ 0.05, B.

Muestra	Concentraciones de la muestra ($\mu\text{g/mL}$)						
	5	10	20	50	70	100	120
	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD ESTABILIZANTE DE RADICALES LIBRES						
Ácido Ascórbico ^A	98.2	99.58	97.11	98.8	97.61	95.6	96.79
Extracto KP ^B	77.39	77.36	76.67	76.88	75.77	76.26	77.46

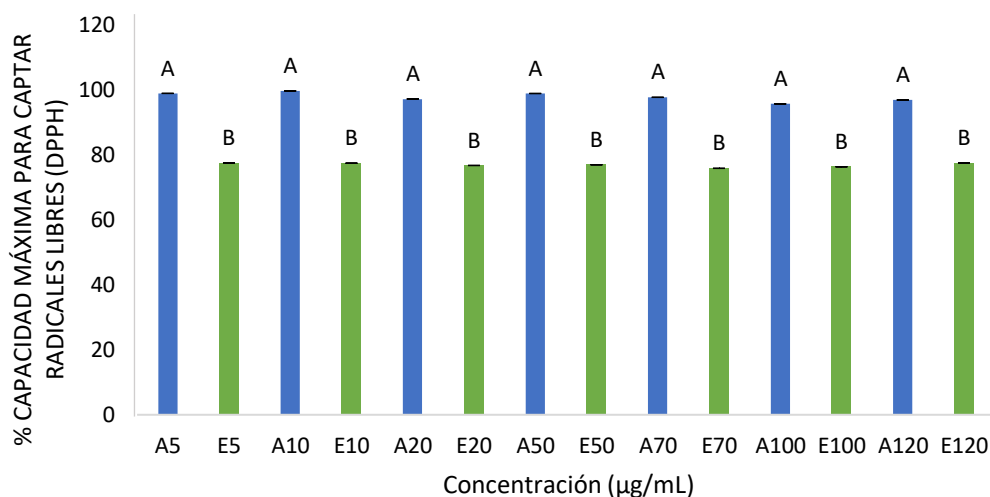
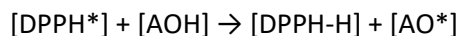


Figura 26. Gráfica correspondiente a la tabla 3 para el porcentaje de la capacidad máxima para captar radicales libres donde (A) corresponde al ácido ascórbico y (E) al extracto de las hojas de *Kalanchoe pinnata*. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de ácido ascórbico y extracto a las diferentes concentraciones, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3), que no comparten una letra son significativamente diferentes ^Ap $\leq$ 0.05, B.

La capacidad estabilizante de radicales libres se cuantificó con el método descrito por Ohinishi *et al* (1994). Los radicales libres son moléculas que se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, condición que los vuelve altamente reactivos.¹⁶⁴ Dentro del metabolismo humano estas especies se generan en la cadena respiratoria mitocondrial, cuando reacciona el peróxido de hidrógeno con

el hierro en estado iónico, por acción de la ciclooxigenasa o por la reacción de la vitamina C (ácido ascórbico) con el ion ferroso, por la acción de la NDADPH reductasa. Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos naturales de plantas medicinales, pero se ha tenido preferencia por la técnica en la cual se utiliza el radical libre DPPH, ya que dicho radical es susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente reductor¹⁶⁵, como se muestra a continuación.



Por otro lado, la vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina esencial y un importante agente antioxidante hidrosoluble, que se encuentra regularmente en órganos como el ojo, hígado, bazo, cerebro, glándulas suprarrenales y tiroideas, se sintetiza a partir de la glucosa, mediante una serie de reacciones enzimáticas, siendo la L-gulono-γ-lactona oxidasa (GLO) la última enzima involucrada.¹⁶⁶ Dicha vitamina tiene la capacidad de estabilizar radicales libres cediendo un electrón al radical libre y convirtiéndose en el radical ascorbato (Fig. 27), los pares del radical ascorbato reaccionan rápidamente para producir una molécula de ascorbato y una molécula de dehidroascorbato. Debido a que el dehidroascorbato no tiene capacidad antioxidante se convierte nuevamente en ascorbato mediante la adición de dos electrones.^{167,168} Así mismo, dentro del metabolismo existen tres formas de degradar y eliminar el ácido ascórbico: la primera es mediante vía oxidativa catalizada por oxígeno, Fe^{3+} , Cu^{2+} ; la segunda mediante una vía oxidativa sin catalizador; y la tercera mediante condiciones anaerobias. Independientemente de la vía degradativa, la apertura del anillo lactona, elimina irreversiblemente la actividad del ácido ascórbico generando distintos productos: intermediarios polimerizados, ácidos carboxílicos insaturados de 5 y 6 carbonos y productos de fragmentación con menos de 5 carbonos.¹⁶⁹

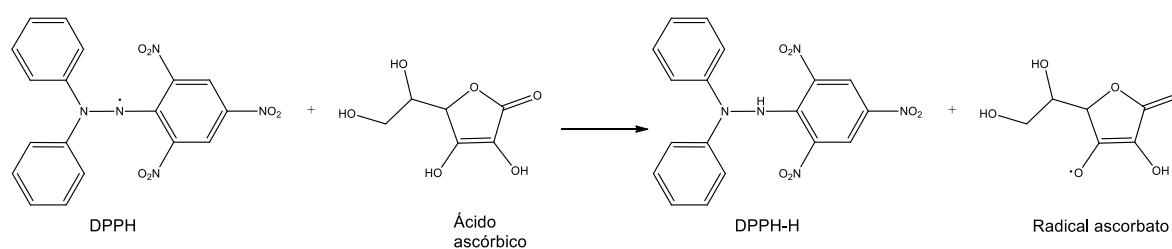


Figura 27. Estabilización de DPPH con un agente antioxidante. (Gerardo-Agosto, 2023).

7.2.3 Contenido de fenoles totales

Se usó la metodología de Singleton-Rossi, para cuantificar el contenido fenólico total (CFT) en un extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata*. Se pudo determinar la concentración de fenoles totales en la muestra utilizando la ecuación de la recta obtenida utilizando ácido gálico como estándar.

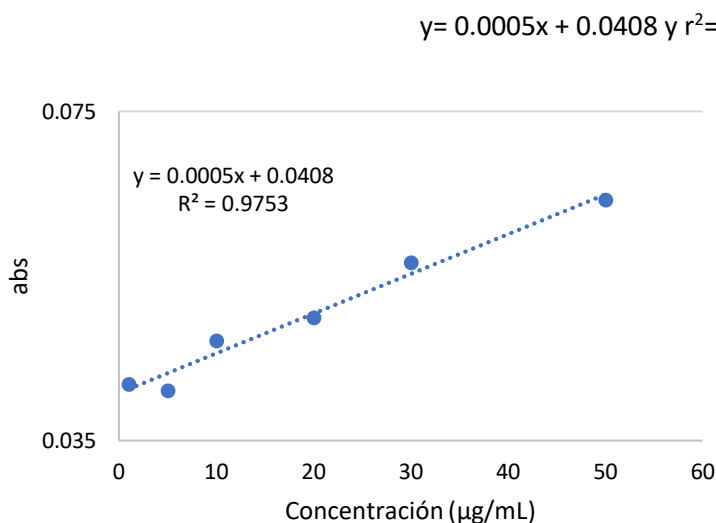


Tabla 11. Concentración de fenoles totales obtenida del extracto de KP a 40 mg/mL con ayuda de la ecuación de la recta de la curva de calibración con el ácido gálico (n=3).

Extracto de KP (mg/mL)	Concentración (mg EAG/g)
40	147.87
Ácido gálico (mg/mL)	Concentración (mg EAG/g)
40	93.6

Figura 28. Curva de calibración del ácido gálico.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cuantificación de contenido fenólico, se encontró que en el extracto de la hoja de KP a una concentración de 40 µg/mL la CFT fue de **147.87 mg EAG/g**, mientras que en el ácido gálico a la misma concentración de **93.6 mg EAG/g** (tabla 11).

El ácido gálico pertenece al grupo de los ácidos fenólicos, y se encuentra distribuido en la naturaleza en frutas y plantas. Posee propiedades antioxidantes y se ha utilizado en la medicina tradicional debido a sus efectos antiinflamatorios, antimicrobianos y anti carcinogénicos.¹⁷⁰ Es bien sabido que distintas plantas medicinales son excelentes fuentes de compuestos fitoquímicos, como los fenólicos y polifenólicos, por ejemplo, los ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, etc.¹⁷¹ La actividad antioxidante de estos compuestos se debe principalmente propiedades redox, donadores de hidrógeno y neutralizadores del oxígeno singulete.¹⁷² Con esta prueba se confirma el contenido de compuestos fenólicos en las hojas de *Kalanchoe pinnata*.

Este método se fundamenta en que los compuestos fenólicos reducen el reactivo Folin-Coicalteu para formar un complejo que absorbe a 765 nm. El CFT se expresó en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo (mg EAG/g), se utilizó una curva de calibración de ácido gálico con concentraciones de 1 hasta 50 µg/mL (Fig. 28), ya que este compuesto se utiliza como estándar debido a su estabilidad y capacidad para formar

compuestos coloreados y específicos de los fenoles, a partir de esta curva obtenida, que muestra la relación entre la absorbancia y la concentración obtenida de ácido gálico.

7.2.4 Habilidad para descomponer peróxido de hidrógeno.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12, la cual indica que a concentraciones establecidas indicaron una capacidad mayor al 50% de CDP. Los resultados indican la relación que existe entre los componentes que tienen esta capacidad y la disminución de la concentración de H_2O_2 en el sistema de medición utilizado. Entre los componentes con la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno se encuentran las enzimas catalasa, peroxidasa y algunos iones como cobre, hierro y zinc, así como algunas vitaminas. Todas ellas pueden estar presentes en los extractos de plantas medicinales.¹⁵⁶

Tabla 12. Capacidad para descomponer H_2O_2 en un extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata* a diferentes concentraciones. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3), que no comparten una letra son significativamente diferentes ^Ap $\leq$ 0.05, B.

HABILIDAD PARA DESCOMPONER PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	
Concentraciones de la muestra (mg/mL)	CDP (%)
40	65.4 $\pm$ 5.8 ^A
50	55.8 $\pm$ 4.7 ^B
60	54.7 $\pm$ 1.8 ^B
70	58.1 $\pm$ 5.0 ^B
80	51.9 $\pm$ 3.9 ^B

La metodología utilizada para determinar la capacidad del extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata* para descomponer peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fue la establecida por Ruch. La habilidad para descomponer H_2O_2 está relaciona con la enzima catalasa, la cual es una enzima antioxidante que acelera la descomposición de esta molécula en hidrógeno y oxígeno. Esta reacción es crucial para neutralizar los efectos tóxicos de dicha molécula, ya que el daño oxidativo que ocasiona puede resultar en la oxidación y alteración de los compuestos celulares incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que conlleva a disfunciones celulares e incluso enfermedades.^{173,174} Algunas plantas poseen esta habilidad, así como otros mecanismos antioxidantes que les ayudan a protegerse del estrés oxidativo.^{175,176} En muchos organismos, el H_2O_2 puede ser un producto natural del metabolismo y de igual forma puede acumularse como el resultado de condiciones ambientales adversas, como la exposición a luz intensa, radiación UV, sequía, estrés térmico y contaminación. Además de la catalasa, las plantas poseen otras enzimas como la peroxirredoxina y la ascorbato peroxidasa, las cuales están involucradas en el proceso de H_2O_2 . Sin embrago, también tienen una red de antioxidantes no enzimáticos, como el glutatión y carotenoides que ayudan a neutralizar el H_2O_2 y otros radicales libres.^{177,178}

los resultados indican que el extracto podría tener cualquiera de estos compuestos por lo que su capacidad para descomponer el peróxido de hidrógeno fue evidente.

7.2.5 Barrido de radicales Superóxido

En la figura 29, se muestra la gráfica con los resultados obtenidos, teniendo como referencia al ácido ascórbico. El aumento de absorbancia indica una mayor concentración de radicales superóxido. Los resultados indicaron que, al aumentar la concentración del extracto, la absorbancia fue disminuyendo, lo cual indicó que la concentración de radicales superóxido fue disminuyendo. La actividad en función de la concentración del extracto de la planta fue similar al del estándar de ácido ascórbico, lo que indica que la planta posee una capacidad similar a la del ácido ascórbico.

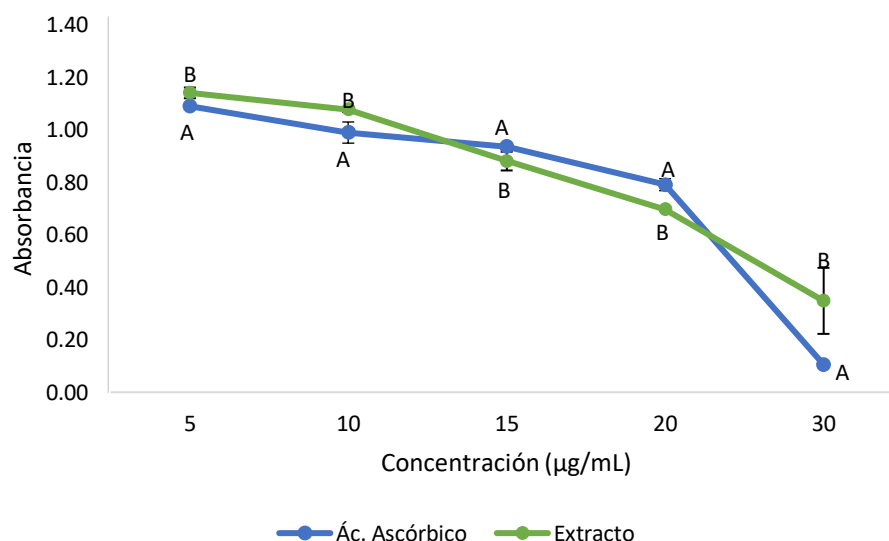


Figura 29. Barrido de Radicales Superóxido en un extracto metanólico de las hojas de *Kalanchoe pinnata* y ácido ascórbico en diferentes concentraciones. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de ácido ascórbico y extracto a las diferentes concentraciones, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

El estudio de la actividad de barrido de radicales superóxido se realizó de acuerdo a la metodología establecida por Beuchamp, la cual se basa en la capacidad del extracto acuoso de las hojas de *Kalanchoe pinnata* para inhibir la formación de los radicales superóxido (RS) formados en el sistema riboflavina-luz-azul de nitrotetrazolio. Los radicales superóxido son un tipo de EROs altamente reactivos, por su inestabilidad, que se generan como subproductos del metabolismo celular especialmente en las mitocondrias, donde se produce en la cadena respiratoria como resultado de una reducción incompleta del O_2 , cuyo daño está relacionado con diversas enfermedades y procesos inflamatorios.¹⁷⁹ Para contrarrestar los efectos ocasionados por estos radicales, los organismos han empleado sistemas de defensa antioxidantes que

incluyen enzimas como la SOD, la cual cataliza la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno y este a su vez, mediante la CAT y la glutatión peroxidasa lo convierten en agua y oxígeno.^{180,181}

El barrido de radicales superóxido es esencial para mantener el equilibrio redox en los organismos y prevenir el daño oxidativo, incluso se puede decir que, desempeña un papel crucial en la protección de las células contra el estrés oxidativo,¹⁸² asimismo, los sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y otras enzimas antioxidantes, trabajan en conjunto para convertir y neutralizar el superóxido, manteniendo así la homeostasis redox y preservando la integridad de las células y tejidos.¹⁸³ Además de las enzimas antioxidantes, las plantas producen moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión y tocoferoles, que actúan como donantes de electrones y neutralizan a los RL, incluyendo el superóxido, protegiendo a las células vegetales del daño oxidativo.^{184,185}

De acuerdo con los estudios fitoquímicos y de las propiedades antioxidantes realizados en la planta, se puede afirmar que las hojas de *Kalanchoe pinnata* poseen taninos, flavonoides, terpenoides, esteroides y glucósidos, metabolitos que ayudan a mantener un equilibrio con agentes oxidantes y dañinos para las células. Al comparar la cantidad fenoles totales en el extracto realizado, con otras especies de *Kalanchoe*, se observaron diferencias. *Kalanchoe pinnata* mostró un contenido total de fenoles de 147.86 EAG/g mientras que *K. daigremontiana* obtuvo una concentración de 14.17 EAG/g y *K. nykæ* un valor de 9.61 EAU/g, lo cual demuestra que la especie *K. pinnata* posee una mayor cantidad de contenido fenólico total. En comparación con agentes antioxidantes de origen natural como el ácido ascórbico, el extracto de las hojas de KP ha demostrado que, al evaluar su actividad antirradical, esta fue, en promedio, 76.83% de capacidad estabilizante, mientras que el ácido ascórbico tiene un promedio de 97.76%. La bibliografía reporta que *K. daigremontiana* posee 56.87% de actividad. Esto indica que *Kalanchoe pinnata* presenta 19.96 % más actividad que la otra especie. El extracto de las hojas de KP mostró un comportamiento similar al ácido ascórbico en relación con el barrido de radicales superóxido, ya que conforme aumentaba la concentración tanto del extracto la absorbancia iba disminuyendo, lo cual indicó una menor presencia de radicales superóxido. Por último, la habilidad para descomponer H_2O_2 mostró una relación no proporcional a esta actividad, es decir, conforme aumentaba la concentración de extracto de hojas de KP disminuía la habilidad para descomponer H_2O_2 , esto se deba posiblemente a una limitación enzimática, es decir, a medida que se aumenta la concentración del extracto de la planta, también se incrementa la cantidad de enzimas presentes, asimismo, podría haber un punto en el que las enzimas se vuelvan limitantes debido a la saturación de su actividad. En este caso, un mayor contenido enzimático no necesariamente aumentaría la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno, ya que las enzimas están funcionando a su máxima capacidad.

Aunque las actividades medidas presentaron una eficacia mayor al 50%, este resultado no se puede generalizar a todas las especies de plantas de un mismo género, ya que, en cada planta, puede variar la síntesis de metabolitos secundarios dependiendo de factores como la temperatura, la disponibilidad de agua, intensidad lumínica, contaminación, etc. Cada planta es única y responde de manera individual a su entorno, lo que genera una diversidad de respuestas y resultados. Como ejemplo, se tiene la figura 30, en la cual se observan las diferencias de las plantas KP en la cual se observan las flores producidas por KP en el municipio de Texcoco, Estado de México, donde las condiciones ambientales y meteorológicas son diferentes al municipio de Tuxtepec, Oaxaca, donde fue sembrada y cosechada para este trabajo, cabe mencionar que en esta región KP no presentó flores, lo cual plantea diversas interrogantes relacionadas con las propiedades de las plantas cultivadas en distintos municipios.

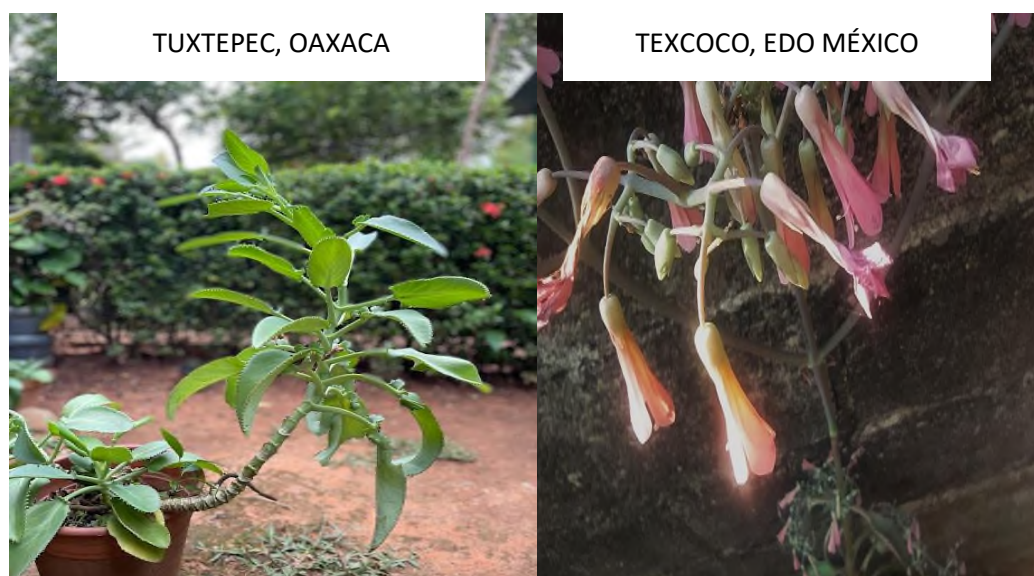


Figura 30. Comparación de *Kalanchoe pinnata* en el municipio de Texcoco, Estado de México y en Tuxtepec, Oaxaca. (Gerardo-Agosto; Navarro-Moreno, 2022).

7.3 Grupos expuestos a alta concentración de azúcar y tratados con extractos acuosos de hojas de *Kalanchoe pinnata*

7.3.1 Ensayos fisiológicos

Como primera determinación, se procedió a monitorear la concentración de glucosa en sangre de los grupos de ratas Wistar macho y hembra expuestos a una solución alta en sacarosa. Los datos se mostrarán analizando lo que sucedió en los machos y en las hembras por separado y después se realizará una comparación entre los géneros.

7.3.2 Glucosa en sangre

Ratas macho. La figura 31, muestra la concentración de glucosa en sangre. El grupo control no presentó cambios significativos ($p > 0.05$) manteniendo la concentración de glucosa en sangre constante. En el grupo expuesto a sacarosa (azúcar común) hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) con respecto al control final aumentando 125 unidades (mg/dL). El grupo tratado con el extracto acuoso de las hojas de KP (en la gráfica, EKP) mostró un incremento no significativo en las concentraciones de glucosa al comparar los grupos inicial y final ($p < 0.05$). Cuando los roedores fueron expuestos a azúcar y tratados con KP se observó un aumento de glucosa en sangre en el grupo final con respecto al grupo control inicial, de 110 unidades (mg/dL) ($p < 0.05$). Este comportamiento fue similar a los roedores expuestos a una solución de azúcar. En este caso, el extracto de KP no ayudó a mantener bajos los niveles de glucosas en sangre al estar los animales expuestos a azúcar. A y B indican la comparación entre grupo inicial y final en cada caso.

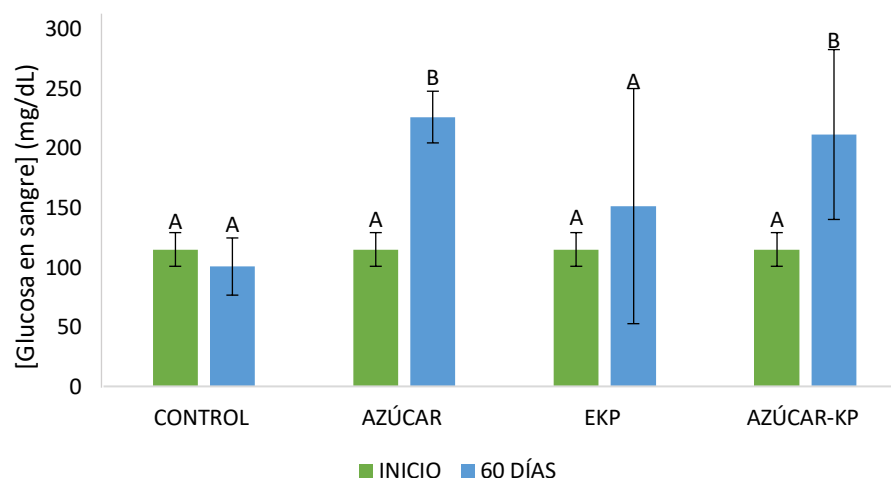


Figura 31. Concentración de glucosa en sangre en ratas wistar macho a los tiempos inicial y final de 60 días. El análisis estadístico se realizó comparando los valores de inicio y 60 días de cada grupo, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $A_p \leq 0.05$, B.

Al observar el incremento de glucosa en sangre a los 60 días de exposición a azúcar, surgió la pregunta ¿qué pasa después de los 60 días de tratamiento? Por ello se decidió llevar dos grupos (control y azúcar) a un periodo de tratamiento de 90 días con el fin de saber cómo evolucionaban los niveles de glucosa en sangre.

La figura 32 se puede observar que la concentración de glucosa fue constante en el grupo control durante el periodo establecido, mientras que en el grupo expuesto a la solución de azúcar la concentración de glucosa en sangre aumentó 80 unidades más a los 90 días.

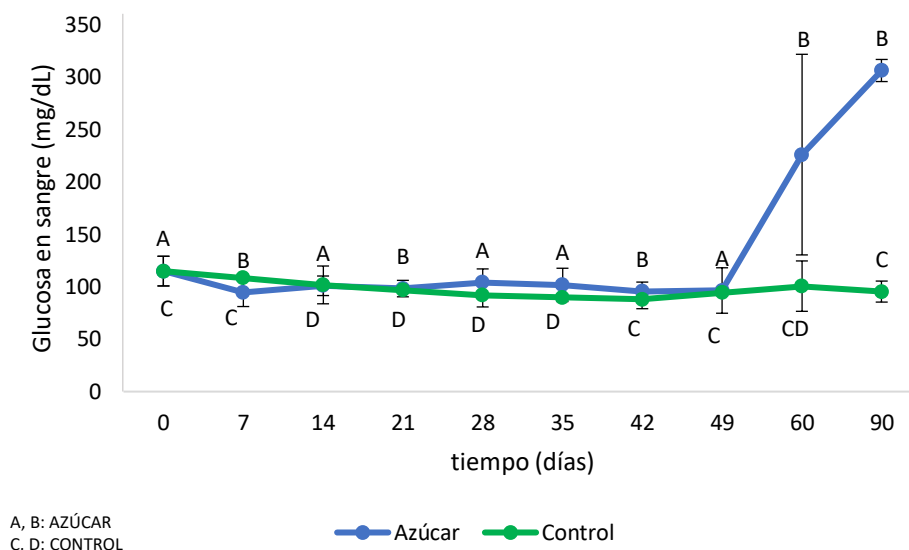


Figura 32. Concentración de glucosa en sangre de los grupos Control y Azúcar de cero a 90 días. El análisis estadístico se realizó comparando las concentraciones de los grupos control y azúcar para cada tiempo, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, $B, y ^C p \leq 0.05$, D .

Ratas hembra. En ellas se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en grupos control, azúcar y azúcar +KP finales en comparación con el grupo inicial. La figura 30 muestra los resultados obtenidos. En relación con el grupo control, se observó un aumento de 8 unidades; para el grupo expuesto a azúcar de 184 unidades y para el grupo azúcar-KP de 56. Para el grupo EKP se detectó un incremento, pero sin ser significativo estadísticamente ($p > 0.05$). Todo lo anterior indica que la exposición a la solución de azúcar en ratas hembra ocasiona un aumento de la concentración de glucosa en sangre mucho mayor al observado en ratas control. Cuando las ratas son expuestas al extracto de KP no hay un incremento significativo de glucosa en sangre y cuando los animales son expuestos a azúcar y tratados con KP en aumento de la concentración en sangre es mucho menor que el observado en el grupo expuesto solo a azúcar, por lo que el extracto, posiblemente, está contribuyendo a mantener los niveles de glucosa en sangre en valores parecidos a los del grupo control o el expuesto solo a KP.

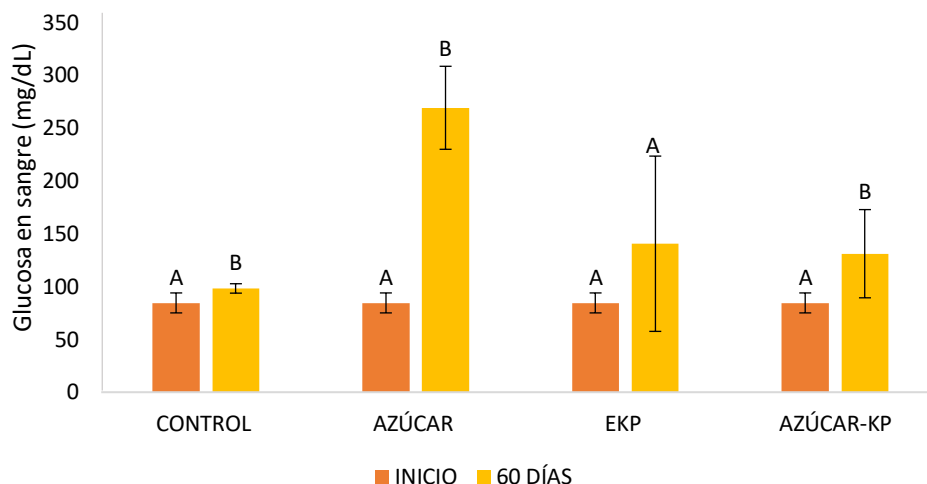


Figura 33. Concentración de glucosa en sangre en ratas Wistar hembra a los tiempos inicial y final (60 días). El análisis estadístico se realizó comparando las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos experimentales para cada tiempo, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

Machos y hembras. La figura 34 muestra la comparación de los resultados en función del sexo de los animales.

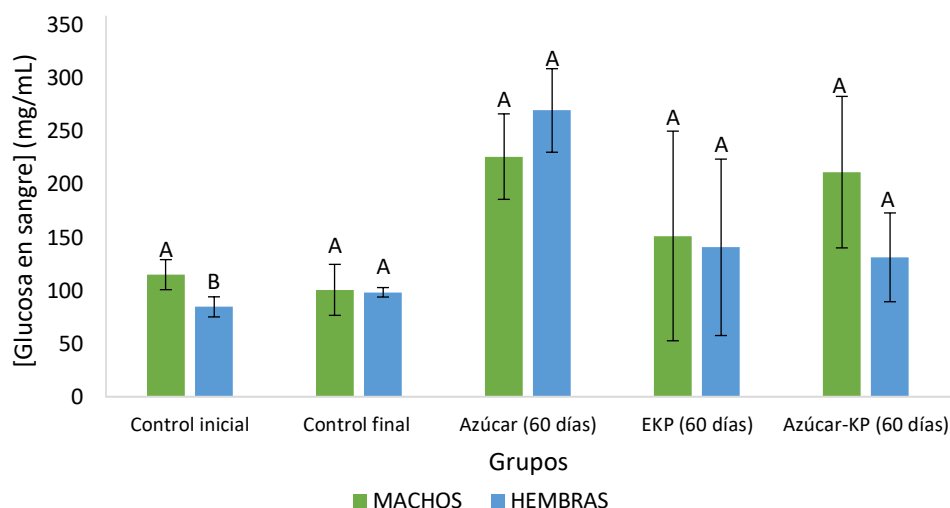


Figura 34. Concentración de glucosa en sangre en ratas Wistar para los 5 grupos de estudio de ambos sexos. El análisis estadístico se realizó comparando las concentraciones de glucosa en sangre de los grupos experimentales para cada tiempo, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

Al realizar la comparación de la concentración de glucosa en sangre, en los cuatro grupos, machos y hembras (fig. 34), se observó que un comportamiento similar de la glucosa en los grupos establecidos, a excepción del grupo control inicial en donde se observó que la presencia de glucosa en machos es significativamente mayor

en comparación con las hembras. Por otro lado, en el grupo azúcar, las hembras tuvieron una concentración no significativa de azúcar superior a la de los machos (43.4 unidades más), sin embargo, en los grupos EKP y azúcar-KP, la concentración de glucosa en machos fue mayor que en el grupo de las hembras, pero no presentó cambios significativos (10.7 y 80.1 unidades más, respectivamente).

Las pruebas realizadas, hasta este momento, junto con la revisión bibliográfica y las observaciones de los animales, indicaron que posiblemente se generaron alteraciones en el metabolismo de las ratas, dando inicio al desencadenamiento de nuevas afecciones. Por ello se procedió a realizar la evaluación de algunas características fisiológicas en los diferentes grupos de animales, entre ellas el peso corporal, el peso de los órganos de estudio, el monitoreo de los analitos excretados en orina realizando un Examen General de Orina (EGO) y la determinación cualitativa de inflamación. Las mediciones se realizaron al tiempo inicial y al final después de 60 días de los diferentes esquemas de exposición.

7.3.3 Peso corporal

Se observó el peso inicial a los 0 días y el final a los 60 días y la diferencia de pesos obtenidos durante este periodo. El grupo control indica el comportamiento normal que tienen los roedores desde el inicio hasta los 60 días.

Ratas macho. La tabla 13 muestra los pesos inicial y final en ratas Wistar macho. Todos los grupos presentaron un incremento significativo en sus pesos corporales.

Tabla 13. Pesos corporales de ratas Wistar al inicio y al final del tratamiento experimental. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=6), que no comparten una letra son significativamente diferentes ^Ap $\leq$ 0.05, B.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Δ de pesos
Control	137.8 $\pm$ 7.6 ^A	218.3 $\pm$ 25.7 ^B	80.6
Azúcar	132.8 $\pm$ 4.5 ^A	202.3 $\pm$ 23.3 ^B	69.5
EKP	135.5 $\pm$ 8.1 ^A	232.3 $\pm$ 22.4 ^B	96.8
Azúcar-KP	201.1 $\pm$ 14.4 ^A	267.2 $\pm$ 20.3 ^B	65.4

En condiciones normales los animales aumentaron 80 gramos en un periodo de 60 días. Cuando son expuestos a la solución de azúcar, también aumentan 69.5 gramos de peso. El extracto de KP provocó un aumento de peso 96 gramos y cuando los animales fueron expuestos a azúcar y tratados con el extracto se observó un aumento de peso de 65.4 gramos. Cada condición reflejó un aumento de peso particular. La tabla indica que la administración del extracto de KP produjo el mayor aumento de peso, mientras que los grupos KP y azúcar-KP no mostraron una diferencia en el aumento de peso, aunque ésta fue menor a la observada en el grupo control y el administrado con KP.

Como se ha discutido anteriormente, la ingesta de azúcar genera condiciones de estrés en el metabolismo, lo conlleva a la causa de que haya un incremento de peso en general de los ratones expuestos en este trabajo. Para el caso de las ratas macho, se observó que durante el periodo de tratamiento el grupo expuesto a azúcar y azúcar-KP dejaron de comer optando por la preferencia de la solución azucarada, lo cual posiblemente pueda estar relacionado con disminución de peso en relación con el grupo control. Por otro lado, el aumento de peso del grupo EKP, puede estar relacionado con la alta presencia de antioxidantes, ocasionando estrés oxidativo que posteriormente genera inflamación de órganos blancos y a su vez un incremento en el peso corporal de los roedores.

Ratas hembra. La tabla 14 muestra los pesos inicial y final en ratas Wistar macho. Todos los grupos tratados presentaron un incremento similar y significativo en sus pesos corporales, y mayor al observado en el grupo control.

Tabla 14. Pesos corporales de ratas Wistar hembra al inicio y al final del tratamiento experimental. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=6), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Δ de pesos
Control	148.8 $\pm$ 15.5 ^A	170.1 $\pm$ 14.4 ^B	21.3
Azúcar	149.2 $\pm$ 4.5 ^A	184.7 $\pm$ 9.6 ^B	35.5
EKP	167.0 $\pm$ 10.1 ^A	199.8 $\pm$ 9.6 ^B	32.8
Azúcar-KP	168.8 $\pm$ 9.5 ^A	202.6 $\pm$ 4.0 ^B	33.8

En el caso de las hembras del grupo control, se observó un aumento, en promedio, de 21 gramos de peso corporal en 60 días. El grupo expuesto a azúcar tuvo un aumento de 35.5 gramos. La administración del extracto de KP produjo un aumento de peso de 32.8 gramos, mientras que el grupo expuesto a azúcar y tratado con el extracto presentó un aumento de peso de 33.8 gramos. El aumento de peso de los grupos experimentales fue semejante entre ellos y en general, fue mayor que el grupo control.

Para el caso de las hembras, el aumento de peso puede estar relacionado con el proceso hormonal. Se sabe que el aumento de tejido adiposo está relacionado con la resistencia a la insulina y a su vez con la inflamación, sometiéndolas a estrés y liberando citoquinas proinflamatorias. Este biomecanismo de defensa puede ser el resultado de los tratamientos administrados en las ratas hembras, lo que pudo haber ocasionado un incremento de peso en los tres grupos con respecto al grupo control, como se ha mencionado en el marco teórico de este trabajo.

Machos y hembras. La tabla 15 muestra el aumento de los pesos de los grupos de ratas macho y hembra.

Tabla 15. Aumento de peso corporal de ratas Wistar macho y hembra. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=6), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B

Grupo	Macho (g)	Hembra (g)
Control	80.6	21.3
Azúcar	69.5	35.5
EKP	96.8	32.8
Azúcar-KP	65.4	33.8

Al comparar los resultados obtenidos en machos y hembras se puede observar que los primeros presentan un aumento de peso mucho mayor que las hembras en todos los grupos. Esto indica una diferencia en el metabolismo en función del sexo de los animales de experimentación, lo que tuvo como consecuencia que el efecto de los diferentes esquemas de tratamiento también variara. Bajo el mismo tiempo de experimentación los machos aumentaron de forma normal aproximadamente 60 gramos más que las hembras. La administración de la solución de azúcar ocasionó una disminución en el aumento de peso de los machos y un aumento en las hembras. El extracto de KP ocasionó el aumento de peso de los machos y de las hembras. Y, finalmente en los animales expuestos a azúcar y tratados con extracto, los machos disminuyeron su aumento de peso en relación con su grupo control, mientras que las hembras lo aumentaron.

Se ha reportado que existen diferentes factores que pueden contribuir con el aumento de peso de los roedores. En los machos, se observó un aumento del tejido adiposo formado en el grupo expuesto a la solución de azúcar. Los demás grupos experimentales no presentaron un cambio significativo con respecto al grupo control. Otro factor que puede contribuir con el aumento de peso en los roedores es el edema (acumulación de agua en el cuerpo y órganos). Este trastorno estuvo mayoritariamente presente en las ratas que fueron expuestas a la solución en crudo de las hojas de KP, ya que al momento de sacrificarlas y extraer los órganos se observó una mayor cantidad de líquido peritoneal (ascitis).

La figura 35 muestra algunas imágenes representativas de los cuatro grupos de ratas macho. En ella se puede observar que en condiciones normales no existen depósitos de grasa en exceso. Cuando los animales son expuestos a la bebida azucarada, se producen cúmulos de grasa muy notorios en el área de los intestinos. Por su parte el extracto de KP no induce la formación de grasa abdominal. Cuando los animales que fueron expuestos a azúcar y tratados con el extracto, se observó que la cantidad de grasa abdominal disminuyó de una forma notoria.

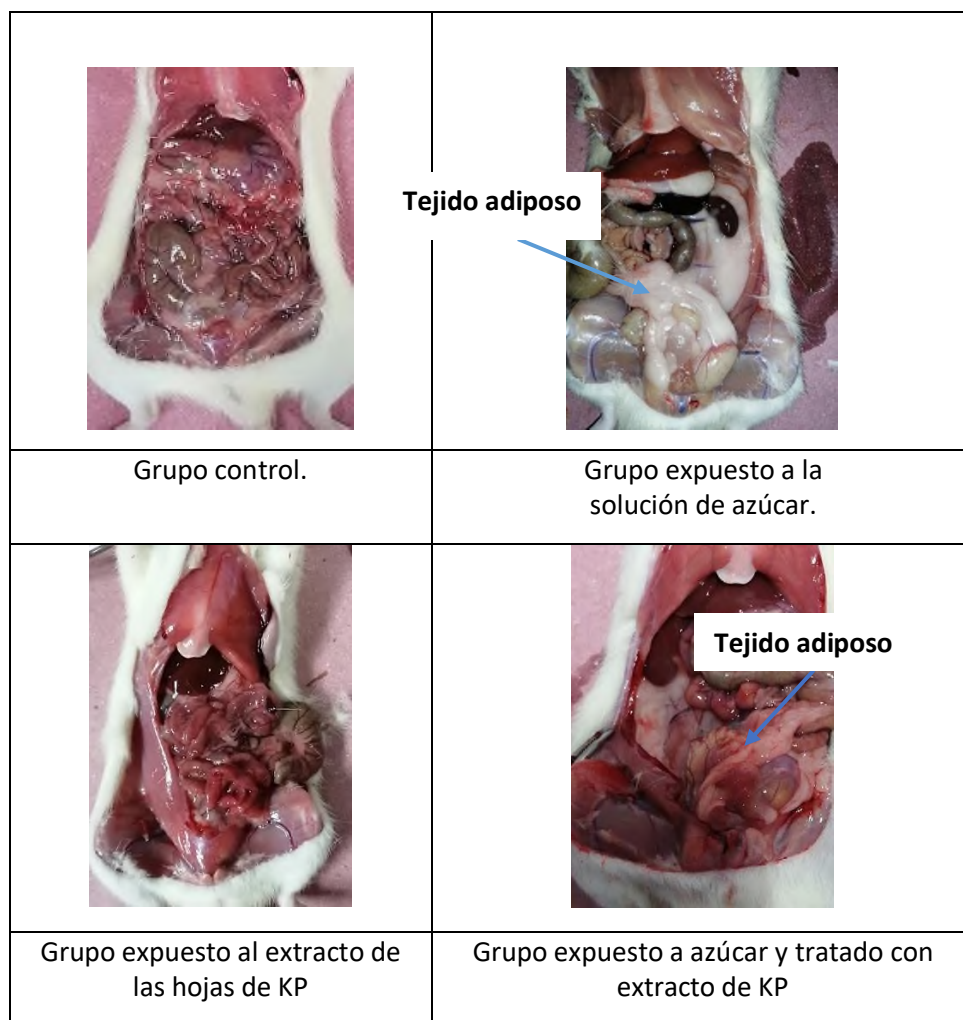


Figura 35. Presencia de tejido adiposo en ratas Wistar expuestas a diferentes tratamientos.

Para explicar el aumento de peso de los ratas, Carvallo² *et. al.*, evidenciaron que la ingesta de fructosa puede influir en la liberación de ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo. Así mismo, las bebidas azucaradas promueven la deposición de lípidos intraabdominales y la producción de lípidos hepáticos, aumento del colesterol y disminución de la sensibilidad a la insulina. Basciano¹⁸⁶ *et. al.*, establecieron que el consumo excesivo de fructosa provoca cambios metabólicos que resultan en la inflamación crónica de bajo grado, resistencia a la insulina y adiposidad. Aunque la fructosa no requiere de insulina, su metabolismo puede promover la inflamación debido al aumento de 11-HSD1, conduciendo al aumento de cortisol intracelular de los adipocitos subcutáneos, generando que menos ácidos grasos entren en el adipocito subcutáneo mientras más son expulsados para almacenamiento en depósitos viscerales y en el hígado.

Por otro lado, las diferencias en el aumento de peso entre ratas machos y hembras se deben principalmente a factores hormonales y fisiológicos. La testosterona, una hormona sexual masculina, desempeña un papel

crucial. Esta hormona promueve el desarrollo de masa muscular y una mayor síntesis de proteínas, lo que puede resultar en un aumento de peso más significativo en los machos. Por otro lado, las hembras tienen niveles más bajos de testosterona y, en cambio, tienen una mayor proporción de estrógeno, que puede influir en la distribución de la grasa en el cuerpo. Además de las diferencias hormonales, también existen variaciones en la alimentación y el metabolismo entre los sexos. Los machos pueden tener un mayor apetito y una mayor ingesta calórica para mantener sus necesidades energéticas, lo que contribuye al aumento de peso, mientras que las hembras experimentan cambios hormonales durante el ciclo reproductivo que pueden afectar su peso, como el ciclo menstrual y el embarazo. Estos factores hormonales influyen en la distribución de la grasa y la retención de líquidos en las hembras, lo que puede hacer que ganen menos peso en comparación con los machos.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

7.3.4 Peso de los órganos

Ratas macho. La figura 36 muestra el peso de los órganos hígado, riñón y páncreas en el grupo control y los tres grupos experimentales.

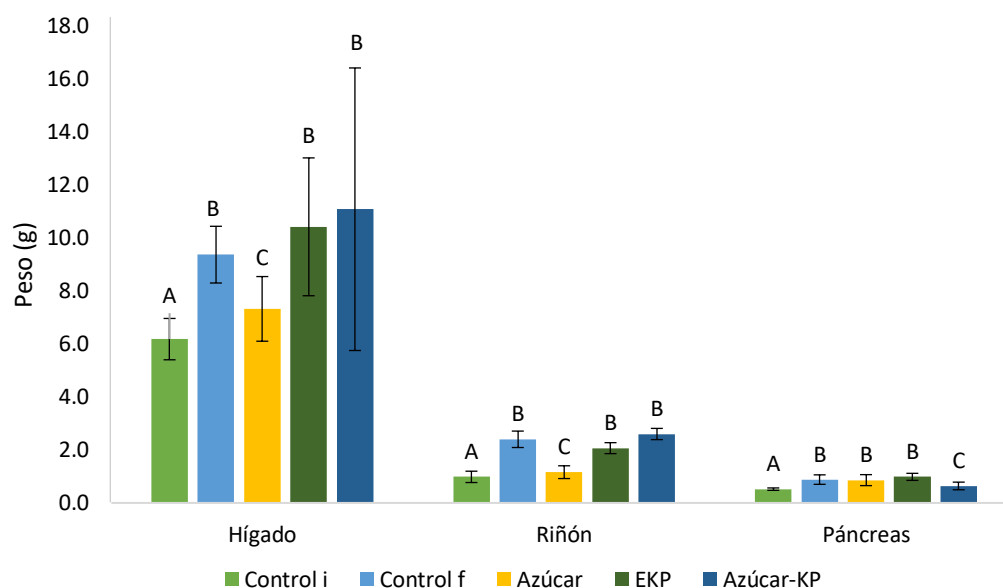


Figura 36. Peso de órganos hígado, riñón y páncreas en ratas Wistar macho. El análisis estadístico se realizó comparando el peso de los órganos de los grupos experimentales para cada órgano, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^a p \leq 0.05$, B, C.

El peso del hígado del grupo control al inicio fue de 6.2 ± 0.78 g, en relación con la edad, el hígado del grupo control final aumentó 3 g teniendo como peso final 9.4 ± 1.07 , ahora, comparando los sistemas de tratamiento de dos meses con el grupo final, se observó que el hígado del grupo azúcar (7.3 ± 1.22 g) disminuyó 2.1

unidades, caso contrario a los hígados del grupo EKP (10.4 ± 2.6 g) e hígado del grupo azúcar (11.1 ± 5.33 g), los cuales aumentaron 1 g y 1.7 g respectivamente en comparación con el hígado del grupo control final.

El riñón del grupo control inicial tuvo un peso de (1 ± 0.21 g), pasado los 60 días, el riñón del grupo control final (2.4 ± 0.31 g) aumentó 1.4 g en referencia al grupo control inicial. Comparando el riñón del grupo control final con los tres grupos en tratamiento, se observó que, el riñón del grupo azúcar (1.2 ± 0.24 g) aumentó 0.2 g; grupo EKP (2.1 ± 0.20 g) aumentó 1.1 g; y el grupo azúcar-KP (2.6 ± 0.21) aumentó 1.6 g.

Por último, el páncreas del control inicial pesó 0.5 ± 0.04 g, el cual aumentó 0.4 g en función del tiempo, reflejado en el peso del páncreas del control final (0.9 ± 0.17 g). Siguiendo el mismo esquema comparativo, se observó que el páncreas del grupo azúcar (0.9 ± 0.2 g), de igual forma que en el control final, aumentó 0.4 g. El páncreas del grupo EKP (1.0 ± 0.13) aumentó 0.5 g, mientras que en grupo azúcar-KP (0.6 ± 0.144) sólo aumentó 0.1 g, en comparación con el grupo control final.

En general los tres órganos, en condiciones control aumentaron de peso en función de tiempo de crecimiento. La administración de azúcar ocasionó aumento de peso en hígado y páncreas mientras que en riñón se observó una disminución. En los tres órganos, el extracto de la planta ocasionó aumento de peso. En el grupo expuesto a la solución de azúcar y tratado con el extracto de la planta se observó un aumento de peso en los tres órganos.

Con estos resultados se pudo observar que en condiciones normales los órganos tienen a aumentar de peso en función del tiempo debido al desarrollo fisiológico de los mismos, sin embargo, cuando se suministró azúcar se observó que el hígado y el riñón disminuyeron en comparación con su grupo control. Por otro lado, en los grupos EKP y azúcar-EKP se observó que el hígado y el riñón aumentaron su peso en comparación con el grupo control, esto puede deberse a varios factores como el almacenamiento de grasa, la acumulación de líquidos o la inflamación. En el caso del páncreas, se observó que el comportamiento del control final, azúcar y EKP fue similar. En el caso del grupo azúcar-KP, se observó que el peso disminuyó en comparación con el grupo control, demostrando que la mezcla de la solución de azúcar con el extracto de KP altera de manera negativa el metabolismo de las células presentes en el tejido pancreático y así mismo su funcionalidad.

Ratas hembra. La figura 37 a muestra el comportamiento de los órganos hígado, riñón y páncreas en el grupo control y los tres grupos experimentales.

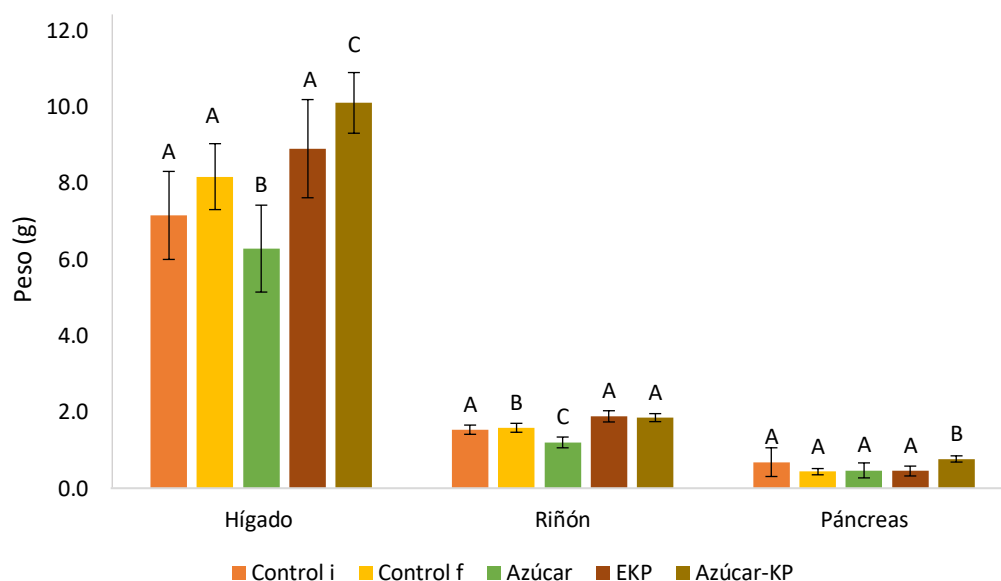


Figura 37. Peso de órganos hígado, riñón y páncreas en ratas Wistar hembra. El análisis estadístico se realizó comparando el peso de los órganos de los grupos experimentales para cada órgano, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $A_p \leq 0.05$, B, C.

En el grupo de las ratas hembra el comportamiento de los pesos de los órganos fue muy diferente al de los machos. Mientras que el hígado y los riñones aumentaron de peso, el páncreas tuvo un peso semejante al inicio y al final de los 60 días. La administración de la solución de azúcar disminuyó el peso de los órganos hígado y riñón mientras que en el páncreas no se observó ningún cambio. La administración del extracto de la planta no ocasionó cambio en el peso de los tres órganos. Finalmente, el grupo expuesto a azúcar y tratado con el extracto de planta originó aumento de peso en los órganos hígado y páncreas, mientras que el riñón no tuvo cambio alguno.

Inicialmente, el hígado pesó 7.2 ± 1.15 g; pasados los 60 días de tratamiento el peso alcanzado fue de 8.2 ± 0.11 g. El aumento no fue significativo. Cuando los animales fueron expuesto a la solución de azúcar, el peso alcanzado (6.3 ± 1.14 g) demostró una disminución significativa de 1.9 gramos disminuyó 1.9 g. El grupo expuesto al extracto (8.9 ± 1.29 g) no mostró una diferencia significativa en relación con el grupo control, mientras que el hígado del grupo azúcar-KP (10.1 ± 0.79 g) aumentó 2.9 g, de forma significativa, en comparación con el grupo control.

En relación con el riñón, se cuantificó un aumento de peso significativo (1 g) en el riñón (peso inicial 1.5 ± 0.12 g y peso final 1.6 ± 1.11 g). El peso de los riñones de los animales expuestos a la solución azucarada mostró

una disminución de peso de 0.3 gramos (1.2 ± 1.14 g) con significancia estadística al compararlo con el grupo control. En los grupos EKP (1.9 ± 0.14 g) y azúcar-KP (1.9 ± 0.10 g), los aumentos de peso no fueron significativos ni entre ellos ni en relación con el control

El páncreas tuvo un peso inicial de 0.7 ± 0.37 g, mientras que el peso final fue de 0.4 ± 0.82 g, estos cambios no fueron significativos. Los grupos azúcar (0.5 ± 0.19 g) y EKP (0.5 ± 0.12 g) no presentaron diferencia significativa con el control. El grupo expuesto a la solución azucarada y tratado con extracto de KP, presentó un aumento significativo de 0.4 g (0.8 ± 0.08 g).

Los resultados anteriores muestran que, en las hembras, el aumento de peso de los órganos en función de la edad no presentó cambios significativos, sin embargo, cuando se les administró la solución de sacarosa se observó que el hígado y el riñón disminuyeron de peso en comparación con los grupos controles y expuesto a la solución de KP, teniendo un comportamiento similar a los machos, lo cual indica que estos órganos independientemente del proceso hormonal, son susceptibles a estrés ocasionado por la alta presencia de azúcar. También se observó que un incremento de peso en el hígado y en el páncreas del grupo azúcar-KP, lo cual puede estar relacionado con la alteración del metabolismo de los órganos ocasionando acumulación de líquidos, inflamación o almacenamiento de grasa. Sin embargo, en condiciones normales, se observó que la variable del tiempo/edad para el caso del riñón si es un factor que se debe de tomar en cuenta, ya que de acuerdo con la figura 37, se observó un cambio significativo de pesos entre el control inicial y el control final. Para corroborar las observaciones anteriores se llevó a cabo la relación peso del órgano/peso corporal

Relación peso del órgano /peso corporal en machos y hembras.

Los datos anteriores denotan cambios en pesos corporales y órganos en los diferentes grupos de estudio de tal manera que se procedió a hacer una tabla en donde la relación peso corporal/peso del órgano indica si las condiciones de experimentación provocaron alguna condición fisiológica que pudo alterar la relación normal. Se ha reportado que un requisito importante dentro de los experimentos toxicológicos es la capacidad de evaluar los efectos de los xenobióticos en órganos específicos. Muchas veces esto se hace mediante exámenes macroscópicos de los órganos, pesándolos o haciendo exámenes histológicos. El peso del órgano puede ser el indicador más sensible del efecto de un compuesto experimental, ya que las diferencias significativas en el peso de los órganos entre animales tratados y no tratado pueden ocurrir en ausencia de cambios morfológicos.^{190, 191}

Dentro del trabajo de laboratorio experimental, diversos estudios han demostrado que la relación peso órgano/peso corporal es de suma importancia ya que revelan patrones de selección de los grupos

establecidos, como es el tamaño de camada, factores genéticos, ambientales, agentes xenobióticos y esquemas de tratamiento. Lo anterior mencionado, puede influenciar en el desarrollo corporal de los mamíferos de estudio marcando diferencias entre los órganos ratas del mismo grupo. La tabla 16, muestra la relación de los pesos de los órganos entre el peso corporales de las ratas hembras y machos.

Tabla 16. Relación de peso órgano/peso corporal de los grupos de ratas Wistar, hembras y machos, empleados en este trabajo (n=6).

Esquemas de tratamiento										
	CONTROL INICIAL MACHO	CONTROL FINAL MACHO	AZUCAR MACHO	EKP MACHO	AZÚCAR-KP MACHO	CONTROL INICIAL HEMBRA	CONTROL FINAL HEMBRA	AZUCAR HEMBRA	EKP HEMBRA	AZÚCAR- KP HEMBRA
PESO CORPORAL	137.78	218.33	202.29	232.33	267.2	148.83	170.13	184.67	199.95	202.57
PESO HÍGADO	6.2	9.4	7.3	10.4	11.1	7.2	8.2	6.3	8.9	10.1
RELACIÓN PESO ORGANO/PESO CORPORAL	0.045	0.043	0.036	0.045	0.042	0.048	0.048	0.034	0.045	0.050
PESO RIÑÓN	1	2.4	1.2	2.1	2.6	1.5	1.6	1.2	1.9	1.9
RELACIÓN PESO ORGANO/PESO CORPORAL	0.007	0.011	0.006	0.009	0.010	0.010	0.009	0.006	0.010	0.009
PESO PÁNCREAS	0.5	0.9	0.9	1	0.6	0.7	0.4	0.5	0.5	0.8
RELACIÓN PESO ORGANO/PESO CORPORAL	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.005	0.002	0.003	0.003	0.004

La tabla indica algunos cambios en la relación peso del órgano/peso corporal, los cuales indican un efecto como consecuencia de los tratamientos de experimentación. Esta tabla sirve detectar cambios que, posiblemente, no se detectaron al observar el peso de los órganos o el peso corporal de los animales de forma individual. En rata macho y hembra se pudo ver que la exposición a la solución azucarada ocasionó un cambio en la relación al comparar este grupo con el grupo control final. De la misma forma se comprobó que el tratamiento con el extracto de la planta en las ratas expuestas a azúcar logró revertir la relación a los niveles de los controles, lo cual indica que el extracto podría normalizar el o los procesos toxicológicos generados por la solución azucarada en los dos órganos de rata macho y hembra. Por otro lado, en el páncreas, los grupos en donde se detectó una alteración de la relación fueron los de machos y hembras expuestos a azúcar y tratados con extracto de KP. Los otros grupos no mostraron diferencia. Ello indica que, probablemente, la combinación de azúcar y extracto originó un efecto en este órgano, debido a que los metabolitos en conjunto afectaron de manera negativa la fisiología y la bioquímica del páncreas, generando procesos como

acumulación de lípidos, inflamación o almacenamiento de grasa, consecuencia de una alteración hormonal o metabólica.

7.3.5 Examen general de orina

El EGO es considerado como una biopsia líquida renal que ofrece información sobre las funciones del riñón y del hígado, proporcionando datos sobre su funcionamiento. Para realizar esta prueba los roedores fueron colocados en una caja metabólica (Laboratorio de Bioquímica Aplicada a las Ciencias Ambientales, UNPA campus Tuxtepec) en un periodo de ayuno de 12 horas para recolectar muestras de orina y analizarlas con un kit comercial (ACON, Mission). La tabla 17 muestra los resultados obtenidos al determinar los analitos excretados en las muestras de orina de las ratas machos control, en un periodo inicial, después de 60 días y finalmente en 90 días. Se determinaron los valores a los 90 días para verificar si, en función de la edad, los animales sufrían de modificaciones severas.

Tabla 17. Examen General de Orina para ratas Wistar macho control ($n=6$), (ND: no detectado).

TIEMPO			
Analito	Inicio	60 días	90 días
Leucocitos (Leu/dL)	ND	ND	70
Nitritos	Positivo 50%	Positivo 50%	Positivo 33%
Urobilinógeno ($\mu\text{mol/L}$)	0.2	0.2	0.2
Proteína ($\mu\text{mol/L}$)	17.5 ± 6.123	18 ± 6.7 (83%) 100 (17%)	15.00
pH	7.8 ± 0.75	7.5 ± 0.316	7.6 ± 0.28
Sangre (Erit/ μL)	ND	ND	ND
Gravedad Específica (mg/gL)	1.005 ± 0.003	1.003 ± 0.005	1.007 ± 0.002
Cetonas (mmol/L)	ND	ND	ND
Bilirrubina ($\mu\text{mol/L}$)	ND	ND	ND
Glucosa (mg/dL)	ND	ND	ND

A los 90 días, el grupo presentó leucocitos, mientras que el 33% de la población dieron positivos a nitritos, estos dos analitos nos indican que existe una posible relación del aumento de edad con la presencia de procesos inflamatorios (cálculos, tumores, enfermedades sistémicas, malformaciones, etc) o infecciosos. No hubo cambio en los niveles de urobilinógeno lo cual indica que posiblemente no existe daño hepático (sin

embrago este resultado no puede excluir, de forma definitiva, la existencia de daños como fibrosis y anemia entre otros), al igual que la bilirrubina. De igual forma no hubo alteraciones en el metabolismo de los CHOs, esto se ve reflejado los resultados de la prueba en cetonas. El 100% de la población no presentó daño renal en los 90 días ya que los valores sangre se mantuvieron negativos y casi constantes los valores de proteína. La orina presentó un pH neutro indicando que no había infección en las vías urinarias ni presencia de cálculos de ácido úrico. Estos resultados nos indicaron que a los 90 días no existen cambios notables de las funciones renal y hepática en las ratas macho, aunque si en los procesos infecciosos, por lo que se confirmó que el uso de los animales a los 60 días fue correcto. Por lo tanto, los datos obtenidos en todas las demás pruebas se realizaron en ratas de 60 días. Con lo anterior en mente, se procedió a determinar los analitos en los diferentes grupos de estudio. La tabla 18 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 18. Examen General de Orina en ratas Wistar macho bajo los cuatro tratamientos determinados a los 60 días (n=6) (ND: no detectado).

ESQUEMAS DE TRATAMIENTO				
Analitos	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
Leucocitos (Leu/dL)	ND	70 (50%) 15 (50%)	70 (16%) Negativo (83%)	70 (16%) Negativo (83%)
Nitritos	Positivo 50%	ND	ND	Positivo 60 %
Urobilinógeno (μmol/L)	0.2	0.2	0.2	0.2
Proteína (μmol/L)	18 ± 6.7 (83%) 100 (17%)	21.0 ± 8.2 (83%) 100 (17%)	15.0	18.0 ± 6.7
pH	7.5 ± 0.316	7.583 ± 0.376	7.6 ± 0.40	7.8 ± 0.27
Sangre (Erit/μL)	ND	ND	ND	ND
Gravedad Específica (mg/gL)	1.003 ± 0.005	1.001 ± 0.002	1.005 ± 0.004	1.008 ± 0.002
Cetonas (mmol/L)	ND	ND	ND	0.5 (80%) Negativo (20%)
Bilirrubina (μmol/L)	ND	+	ND	+
Glucosa (mg/dL)	ND	ND	ND	ND

A los 60 días, las ratas expuestas a la solución azucarada presentaron un 100% de leucocitos a niveles entre 15 y 70, mientras que la solución de las hojas de KP redujo esta concentración hasta un 83%, teniendo un comportamiento similar al grupo azúcar-KP. Esto podría indicar que el azúcar promueve un proceso inflamatorio mientras que la solución de KP lo disminuye. En cuanto a los nitritos, el grupo azúcar y EKP dieron un resultado negativo, y con respecto al grupo azúcar-KP solo hubo un incremento del 10%. La concentración

de urobilinógeno se mantuvo constante para los cuatro grupos. El grupo EKP no presentó proteinuria o daño renal, ya que los valores se mantuvieron constantes a diferencia de los grupos restantes. El pH fue neutro y constante para los cuatro grupos, la igual que la presencia de sangre la cual dio negativo como resultado. El 80% del grupo azúcar-KP fue quien sufrió alteraciones en el metabolismo de los CHOs, indicando una presencia de cetonas, mientras que los tres grupos restantes no sufrieron esta alteración. Los grupos azúcar y azúcar-KP dieron como resultado positivo al prueba de bilirrubina, indicando una posible alteración en el metabolismo y funcionamiento del hígado. Por último, el 100% de los grupos establecidos no presentó glucosuria. En ratas macho, el extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* ayudó a restablecer

Ratas hembra. La tabla 19 muestra los resultados obtenidos comparando a los animales al inicio y al final del periodo de experimentación.

Tabla 19. Examen General de Orina para ratas Wistar hembra control ($n=6$). (ND: no detectado)

Analitos	TIEMPO	
	Inicio	60 días
Leucocitos (Leu/dL)	ND	79 (33.3%) 15 (33.3%)
Nitritos	Positivo 66.6%	ND
Urobilinógeno ($\mu\text{mol/L}$)	0.2	0.2
Proteína ($\mu\text{mol/L}$)	15.0	15.0
pH	7.9 ± 0.2	7.7 ± 0.6
Sangre (Erit/ μL)	ND	ND
Gravedad Específica (mg/gL)	1.003 ± 0.002	1.002 ± 0.002
Cetonas (mmol/L)	ND	ND
Bilirrubina ($\mu\text{mol/L}$)	ND	ND
Glucosa (mg/dL)	ND	ND

Los resultados mostrados en la tabla indican que más del 50% de la población de ratas hembras, presentaron leucocitos al cumplir los 60 días del periodo experimental, lo cual denota procesos infecciosos. Al inicio los animales presentaron nitritos en un 66 %: al cumplir los 60 días no se encontraron estos analitos en el 100% de los animales. No existieron cambios en la concentración de urobilinógeno, proteína, pH y gravedad específica en función del tiempo de crecimiento. No se detectó sangre, cetonas, bilirrubina ni glucosa en los animales en los dos grupos. Estos resultados indicaron que las ratas hembra conservan su estado metabólico a través del periodo experimental en condiciones normales. Cuando los animales fueron tratados con los diferentes esquemas, se llevó a cabo el Examen general de orina para los cuatro grupos a los 60 días de tratamiento. Los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Examen General de Orina en ratas Wistar hembra para los cuatro grupos a los 60 días ($n=6$) (ND: no detectado).

ESQUEMAS DE TRATAMIENTO				
Analitos	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
Leucocitos (Leu/dL)	79 (33.3%) 15 (33.3%) Negativo (33.3%)	70 (66%) 15 (16%) Negativo (14%)	15 (16%) 500 (16%) 70 (67%)	125 (16%) 500 (16%) 15 (16%) Negativo (36%)
Nitritos	ND	Positivo 83%	Positivo 50%	Positivo 50%
Urobilinógeno ($\mu\text{mol/L}$)	0.2	0.2	0.2	0.2
Proteína ($\mu\text{mol/L}$)	15.0	15 (83%) 100 (17%)	15.0	15
pH	7.7 ± 0.6	7 ± 0.6	7.8 ± 0.25	6.9 ± 0.6
Sangre (Erit/ μL)	ND	ND	ND	ND
Gravedad Específica (mg/gL)	1.002 ± 0.002	1.006 ± 0.004	1.005 ± 0.003	1.013 ± 0.006
Cetonas (mmol/L)	ND	ND	ND	0.5 (16%) Negativo (83%)
Bilirrubina ($\mu\text{mol/L}$)	ND	+	Positivo (33.3%) Negativo (66.3%)	Positivo (67%) Negativo (33%)
Glucosa (mg/dL)	ND	ND	ND	ND

Los leucocitos estuvieron presentes en los cuatro grupos experimentales, en el grupo expuesto a azúcar nos detectó un cambio significativo en los valores solo en los porcentajes, ya que el 66 % de la población presentó 70 leucocitos por decilitro. Esta proporción fue conservada en los animales expuestos solo a KP observándose que el 16% presentó un aumento a 500. Por su lado, el grupo azúcar-KP presentó aumento a 125 y 500 leucocitos por decilitro y el caso de resultados negativos aumento a 36%. Esto indica que KP pudo disminuir los casos de presencia de leucocitos en ese porcentaje de la población y por ello los posibles casos de infección. En el caso de los nitritos, el grupo control no los presentó mientras que el grupo expuesto a azúcar mostró un aumento del 83%. El extracto de la planta al igual que el grupo expuesto a azúcar y tratado con extracto, mostraron una disminución de nitritos del 50%, lo que indica que el extracto pudo haber normalizado los niveles de este analito en ratas expuestas a la solución de azúcar. No hubo cambios en la concentración de urobilinógeno y pH para los 4 grupos. En cuanto a la presencia de proteína solo el 17% de la población presente en el grupo azúcar dio un resultado elevado, indicando daño renal, mientras en que los demás grupos el valor el nivel fue normal y constante. En ningún grupo hubo presencia de sangre y glucosa en orina. El 16% de la población del grupo azúcar-KP sufrió alteraciones en el metabolismo de los CHOs dando resultados positivos ante la prueba de cetonas. En comparación con el grupo control, los tres grupos restantes

sufrieron daños hepáticos en diferente proporción: el 100% del grupo azúcar, el 33% de la población del grupo EKP y el 67% de la población del grupo azúcar-KP dieron resultados positivos ante la presencia de bilirrubina.

Machos y hembras. La tabla 21 muestra los resultados obtenidos en machos y hembras. En ella se observan los datos positivos y el porcentaje de ellos. Se eliminaron los datos negativos para poder observar mejor las variaciones en función de los esquemas de exposición y tratamiento.

Tabla 21. Examen general de orina de ratas Wistar macho y hembra de los diferentes grupos experimentales ($n=6$). (ND: no detectado).

ESQUEMAS DE TRATAMIENTO								
Analitos	Control macho	Control hembra	Azúcar macho	Azúcar hembra	EKP macho	EKP hembra	Azúcar-KP macho	Azúcar-KP hembra
Leucocitos (Leu/dL)	ND	Positivo 66%	Positivo 100%	Positivo 82%	Positivo 16 %	Positivo 100%	Positivo 16 %	Positivo 64%
Nitritos	Positivo 50%	ND	ND	Positivo 83%	ND	Positivo 50%	Positivo 60 %	Positivo 50%
Urobilinógeno ($\mu\text{mol/L}$)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Proteína ($\mu\text{mol/L}$)	18 a 100	15.0	21 a 100	15 a 100	15.0	15.0	18.0 $\pm$ 6.7	15
pH	7.5 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.3	7 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.3	7.8 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.6
Sangre (Erit/ μL)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gravedad Específica (mg/gL)	1.003 $\pm$ 0.005	1.002 $\pm$ 0.002	1.001 $\pm$ 0.002	1.006 $\pm$ 0.004	1.005 $\pm$ 0.004	1.005 $\pm$ 0.003	1.008 $\pm$ 0.002	1.013 $\pm$ 0.006
Cetonas (mmol/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Positivo 80%	Positivo 16%
Bilirrubina ($\mu\text{mol/L}$)	ND	ND	+	+	ND	Positivo 33%	Positivo 100%	Positivo 67%
Glucosa (mg/dL)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

La tabla muestra que los resultados obtenidos al analizar los analitos por medio del EGO, dependen del sexo de los animales, del compuesto que se les administre y de la combinación de los mismos. En el caso de los leucocitos, el único grupo negativo fue el de los machos control, los grupos restantes presentaron niveles variables de este compuesto, siendo los machos y hembras expuestos a la solución de azúcar los que mostraron mayor porcentaje y posiblemente mayor índice de infecciones bacterianas. El nivel de nitritos fue igual o mayor al 50 % en todos los grupos menos los del grupo control de las hembras y los machos expuestos a azúcar y KP. La concentración de urobilinógeno fue constante en todos los grupos, así como el valor de pH y la gravedad específica. A nivel renal los grupos no presentaron glucosuria, pero si casos de elevada

proteinuria en los grupos de machos y hembras expuestos a azúcar. El metabolismo de los carbohidratos fue alterado solo en el grupo de ratas macho y hembra expuestas a la solución azucarada y tratadas con el extracto de KP. Se presentó daño hepático en cinco de los ocho grupos, siendo negativo en los grupos control y en los machos tratados con KP.

7.3.6 Proteína-C Reactiva (PCR)

La PCR se ha considerado como un biomarcador clásico de inflamación, participando activamente en la formación y rotura de la placa de ateroma (masa de grasas que restringen el flujo sanguíneo).¹⁹² El suero fue separado del paquete globular y se procedió a hacer la prueba con el kit comercial. En este caso se presentan los resultados obtenidos en machos y hembras juntos. En el caso de los grupos donde hay variabilidad de resultados positivos y negativos solo se muestran los positivos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Ensayo de la Proteína C Reactiva en muestras de suero sanguíneo de ratas Wistar macho y hembra ($n=6$) (ND: no detectado).

Grupo	Machos	Hembras
Control Inicial	ND	ND
Control Final	ND	Positivo 34%
Azúcar	ND	Positivo 100%
EKP	ND	Positivo 50%
Azúcar-KP	Positivo 60%	Positivo 66%

Se observaron diferencias en la presencia de inflamación en función del sexo de los animales y del grupo experimental. En los machos no se desarrolló un proceso inflamatorio hasta que fueron expuestos a la solución de azúcar y tratados con el extracto acuoso de KP (60% de la población). Las ratas hembras fueron más susceptibles al desarrollo de la inflamación. Esta se observó en función de la edad y de la susceptibilidad de los individuos del grupo, ya que a los 60 días el 34% de los roedores la presentaron. El 100% de las ratas hembra expuesta a azúcar presentaron inflamación. Cuando se trató a las hembras con el extracto de KP solo el 50% de ellas fueron positivas, lo que indica que el otro 50% se comportaron como las ratas iniciales. Las ratas hembra fueron más susceptibles a la inflamación ocasionada por la administración de una solución alta en azúcar, pero el extracto de hojas de KP puede lograr que el 37 % de ellas se recuperaran.

Se ha demostrado que la inflamación es un proceso que promueve el desarrollo de ateromas y con ello enfermedades cardiovasculares, que se pueden asociar con las concentraciones de glucosa en la sangre, presencia de tejido adiposo en la zona peritoneal e insulinoresistencia, componentes cruciales de un trastorno metabólico. Esto cual indica que el trastorno metabólico se asocia con valores elevados de PCR,

interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (estas dos últimas son biomoléculas que se asocian con el procesos inflamatorio)^{193,194}. El trastorno metabólico inicialmente se conocía como síndrome X o síndrome de resistencia a la insulina ya que se caracterizaba por una disminución a la insulina, junto con la obesidad peritoneal, hiperglucemia, inflamación crónica e hipertensión arterial.¹⁹⁵

Hasta este punto se puede afirmar que, la solución al 20% de sacarosa puede ocasionar un aumento de concentración de glucosa en sangre en ratas machos y hembras. En machos el extracto de KP no pudo revertir el efecto de la solución azucarada, mientras que en las hembras sí. En cuanto a los pesos, se observó mediante la relación peso órgano/peso corporal, que el grupo azúcar para ambos sexos, es el grupo más vulnerable a perder peso debido a los desequilibrios metabolitos ocasionado por una alta concentración de glucosa presente en el organismo, por su contra parte se demostró que el uso del extracto de KP no tiene relevancia en la ganancia o pérdida de peso para las ratas machos y hembras, sin embargo, al juntar y exponer los grupos a azúcar-KP se observó que estos tienden a aumentar significativamente de peso como consecuencia a los factores expuestos y ocasionado por los esquemas de tratamiento. Así mismo, se observó que las ratas machos del grupo expuesto a la solución de azúcar al 20% desarrolló presencia de leucocitos mientras que el grupo expuesto al extracto de KP y azúcar-KP redujeron esta concentración hasta un 83%, indicando que la planta ocasiona efectos antagónicos ante el comportamiento de los efectos de la sacarosa. Este último grupo desarrolló alteración en el metabolismo de los CHOs, y posibles alteraciones a nivel hepático en las ratas de los grupos azúcar y azúcar-KP. Para el caso de las hembras, los cuatro grupos en tratamiento presentaron la presencia de leucocitos, siendo el grupo azúcar el más vulnerable a infecciones bacterias, mediante el grupo azúcar-KP se indicó que KP pudo disminuir la presencia de leucocitos y así mismo, casos de infección. A su vez, el grupo azúcar fue el único que presentó una concentración alta de nitritos mientras que el grupo azúcar-KP disminuyó esta concentración un 43%, lo que indica que el extracto de KP, como se ha visto con anterioridad, en la mayoría de los casos, contrarresta los efectos ocasionados por la sacarosa. A nivel renal, el 17% de la población del grupo azúcar sufrió daño, mientras que, a nivel hepático, los 4 grupos sufrieron daño en diferente proporción. Por último, mediante la técnica de PCR se observó que las ratas hembras fueron más susceptibles a procesos proinflamatorios independientemente del esquema de tratamiento, mientras que, en los machos, solo se observó un resultado positivo del 60% para el grupo azúcar-KP.

7.4 Ensayos bioquímicos en ratas wistar macho

7.4.1 Especies reactivas de oxígeno

La figura 38 muestra la determinación realizada en los órganos hígado, riñón y páncreas de los animales de los diferentes grupos experimentales. Cada órgano analizado posee una actividad característica, por lo que el análisis de los datos y sus implicaciones se hará de forma individual. Sin embargo, si se observa la figura, se podrá ver que la concentración de EROS de hígado y riñones es semejante en todos los grupos experimentales. Es decir, existe un aumento de EROS que va aumentando en los grupos azúcar, KP y azúcar-KP. El páncreas, por otro lado, mostró un efecto diferente en relación con los dos órganos anteriores, siendo solo el grupo azúcar-KP en donde se detectó un incremento de EROS.

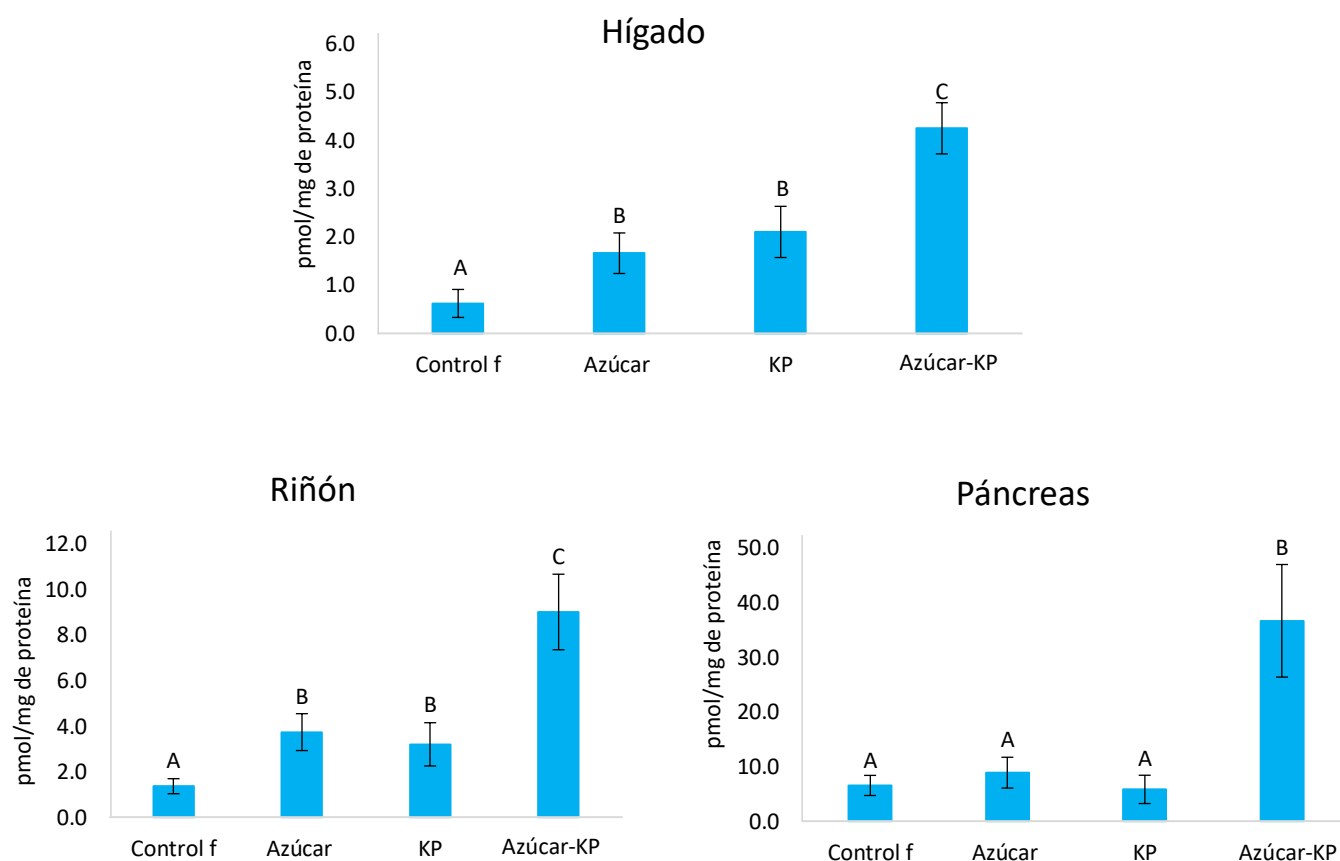


Figura 38. Determinación de EROs en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho bajo los diferentes esquemas de exposición y tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando las concentraciones de EROs en los órganos de los grupos experimentales, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C.

En el hígado, la concentración de EROS en el grupo control fue de 0.62 ± 0.28 pmol/mg de proteína; para el grupo azúcar de 1.66 ± 0.42 pmol/mg de proteína; en el grupo EKP se encontraron 2.101 ± 0.52 pmol/mg de

proteína y para el grupo azúcar-KP se determinaron 4.24 ± 0.52 pmol/mg de proteína. Los valores fueron significativos ya que $p < 0.05$ para los 3 casos en comparación con el grupo control. El aumento de la concentración de EROS en los grupos azúcar y KP, en relación con el grupo control, fue el mismo mientras que el del grupo azúcar-KP fue de casi seis veces en control. Pareciera que en este grupo se sumaran los efectos de los dos anteriores y, por ello, el tratamiento con el extracto de KP no contrarrestara la producción de EROS ocasionada por la exposición a la solución azucarada.

A nivel renal se observó un comportamiento similar al del hígado indicando que, tanto el azúcar (3.37 ± 0.32 pmol/mg de proteína) como el extracto acuso de las hojas (3.19 ± 0.94 pmol/mg de proteína) no generaron aumento de EROs en el riñón. De la misma forma, el comportamiento del grupo azúcar-KP (9.01 ± 1.66 pmol/mg de proteína) fue similar al del hígado.

En el páncreas se obtuvieron los siguientes resultados: los grupos control (6.53 ± 1.84 pmol/mg de proteína), azúcar (8.87 ± 2.82 pmol/mg de proteína) y KP (5.80 ± 2.5 pmol/mg de proteína) no presentaron diferencias significativas, indicando que no la solución azucarada ni el extracto de alteraron el nivel de EROS en este órgano. Sin embargo, cuando se observó el grupo azúcar-KP se detectó un aumento significativo de la concentración de estas especies (36.66 ± 10.3 pmol/mg de proteína), sugiriendo la posibilidad de que los compuestos presentes en el extracto acuso de las hojas de KP puedan estar induciendo un desequilibrio oxidativo dentro del este órgano o que los compuestos antioxidantes presentes en el extracto acuoso no sean suficientes para disminuir los EROs, ya que, como se recordará, el extracto acuoso solo presentó taninos y flavonoides.

Se han reportado varios estudios que avalan la relación existente entre la hiperglucemia y el estrés oxidativo. Entre ellos, Ford¹⁹⁶, y su equipo en 2005, realizaron una investigación con 2, 296 personas adultas, en las cuales se pudo asociar la elevada concentración de glucosa sanguínea con bajos valores de glutatión reducido (GSH) y altas concentraciones de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Otro estudio epidemiológico demostró que en personas adultas sin antecedentes de diabetes existe una relación inversa entre la concentración de glucosa sanguínea y la concentración de alfa-tocoferol plasmática, después de ajustarse el análisis por edad, sexo, hábito de fumar, actividad física, entre otras variables relacionadas con el estrés oxidativo.¹⁹⁷ Una investigación realizada en Cuba, demostró que, en niños y adolescentes con diabetes tipo 1, presentan niveles más altos de proteínas oxidadas y niveles más bajos de GSH, así como una actividad reducida de las enzimas CAT y SOD en comparación con los niños del grupo de control. Además, se encontró una correlación significativa negativa entre los niveles de malondialdehído (MDA) y los niveles de glutatión

reducido (GSH), así como entre los niveles de grupos carbonilos (proteínas oxidadas) y la actividad de la SOD.¹⁹⁸

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio utilizando células endoteliales de la vena umbilical, las cuales fueron expuestas a concentraciones elevadas de glucosa durante un período de 2 semanas. Se observó que, a partir del séptimo día de tratamiento, se produjo un aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Asimismo, se realizó una investigación similar utilizando fibroblastos humanos expuestos a concentraciones de glucosa de 5 mmol/L y 22 mmol/L durante 12 semanas. En este caso, se encontró que los fibroblastos de pacientes diabéticos con nefropatía presentaban una disminución en la expresión de estas enzimas antioxidantes, a diferencia de los pacientes diabéticos sin nefropatía y de aquellos sin diabetes, pero con afectación renal.¹⁹⁹

Díaz-Arce,²⁰⁰ en 2006, demostró que las EROs generadas ante el aumento de glucosa son capaces de inducir la síntesis de enzimas antioxidantes como Cu/Zn-SOD, CAT y GPx. Sin embargo, cuando la concentración de glucosa es elevada, como en pacientes diabéticos o hiperglucémicos, la situación difiere, esto puede deberse a que la hiperglicemia crónica mantiene un estrés oxidativo capaz de dañar moléculas de importancia biológica. En la figura 39 se muestran algunos mecanismos de las EROs y el desbalance redox en un paciente diabético, el cual demuestra que las elevadas concentraciones de glucosa pueden aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), por diferentes vías: aumentando la formación de los productos de glicosilación avanzada (PGA); activando a la proteína quinasa C (PQC); disminuyendo el NADPH + H⁺ intracelular; activando la producción de EROs en la mitocondria.

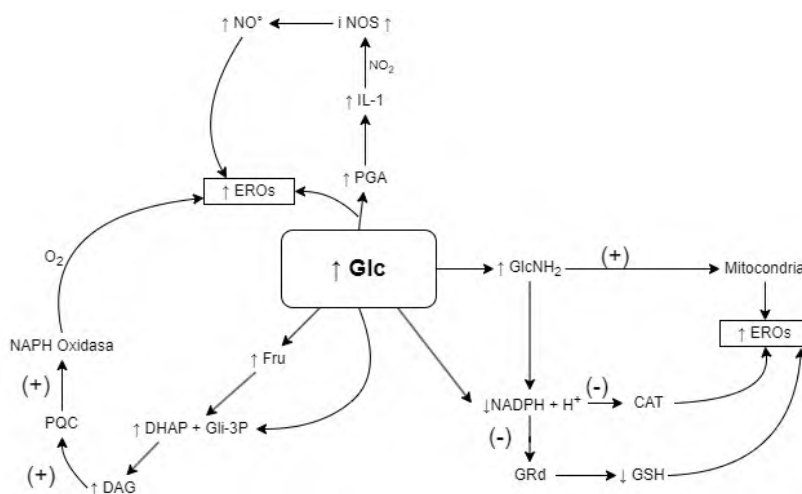


Figura 39. Mecanismos de EROs y desbalance redox (Díaz-Arce, 2006). CAT: catalasa, GSH: glutatión reducido, GRd: glutatión reductasa, Fru: Fructosa, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, Gli-3P: gliceraldehído 3 fosfato, DAG: diacil glicerol, GlcNH2: glutamina, Glc: glucosa, las flechas hacia arriba o abajo indican que aumenta o disminuye respectivamente, (+): indica que se activa, (-): indica que se inhibe.

La figura 40 muestra la comparación de la concentración de EROs en los tres órganos de estudio.

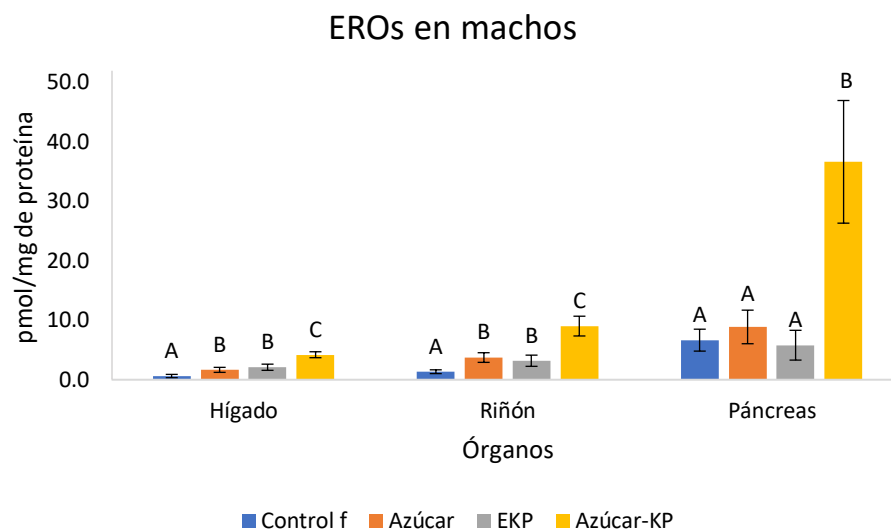


Figura 40. Comparación de la concentración de EROs en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C.

A nivel hepático se almacena el glucógeno, que es una forma de glucosa, para liberarlo en la sangre cuando los niveles de glucosa son bajos. Sin embargo, cuando la hiperglucemia es crónica, el hígado tiende a experimentar estrés oxidativo debido a los mecanismos mencionados anteriormente.¹⁴ Se sabe que el exceso de glucosa en la sangre aumenta la formación de EROs en el hígado, dañando las células hepáticas y provocando inflamación. Además, la hiperglucemia puede producir y utilizar antioxidantes endógenos, como el glutatión, que son importantes para neutralizar las EROs y proteger las células contra el daño oxidativo.²⁰¹ La glucosa administrada en este modelo experimental demostró que si podría promover la formación de EROs al igual que el extracto acuoso de las hojas de KP administrado, estos resultados se comprueban con el sistema competitivo azúcar-KP, ya que hubo un doble incremento en la concentración de EROs en el hígado. Cabe mencionar que, aunque el extracto acuso contiene metabolitos que pueden servir como antioxidantes, estos a nivel hepático pueden inhibir la actividad de las enzimas encargadas del sistema antioxidante, provocando un aumento en la concentración de EROs.

En relación con el riñón, el desequilibrio oxidativo que puede sufrir al ser expuesto a agentes nefrotóxicos (EROs) o infecciosos, como también obstrucciones de la vía urinaria se puede asociar a un predominio pro-oxidante respecto a las defensas antioxidantes. Los lípidos de las membranas de las células renales son las principales moléculas que sufren el daño oxidativo, dando lugar a la peroxidación. Esta lipoperoxidación

compromete la integridad de la membrana basal y del epitelio de los del riñón, por lo que también puede afectar su funcionalidad.²⁰² Los EROs producidos por las altas concentraciones de glucosa pueden generar nefritis por formación de inmunocomplejos y estos a su vez estimulan a los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos a producir radicales libres aniones superóxido los cuales participan en el aumento de EROs, en el desarrollo de daño renal y en la formación de proteinuria²⁰³ ocasionando pérdida de nefronas aumentando la producción de EROs y la lipoperoxidación^{204,205}.

Diferentes estudios han demostrado la relación del metabolismo oxidativo y la inflamación pancreática, indicando que el estrés oxidativo pancreático tiene lugar en las etapas iniciales de su inducción. Sin embargo, se ha observado que el tratamiento con agentes antioxidantes reduce el daño ocasionado en las células acinares (encargadas de la síntesis y secreción de las enzimas y proenzimas), lo que sugiere a la formación de EROs reduciendo la defensa de antioxidantes.²⁰⁶

Aunque no se conoce con certeza las causas del estrés oxidativo pancreático, se piensa que su origen podría estar relacionado con factores presentes en la dieta o en el ambiente, como algunos aceites de alto contenido de ácidos grasos, el humo del tabaco, productos petroquímicos o pesticidas, el causante del estrés oxidativo en la célula acinar por parte de las enzimas participantes la glucagón transferasa o el citocromo P450 2E1.^{207,208} Existe una hipótesis en donde las células acinares, representantes del 90% del parénquima pancreático, se ven sometidas a una situación de estrés creado por la exposición a factores agresivos externos, en las cuales liberan citocinas y EROs que crean un ambiente oxidativo pancreático, sin lesiones perceptibles.²⁰⁹

7.4.2 Glutación-S Transferasa

En la figura 41 se observa la actividad de la GST en hígado, riñón y páncreas de las ratas expuestas a los diferentes grupos experimentales.

En el hígado, la actividad de los grupos control ($6.85 \pm 3.41 \mu\text{mol/mg/min}$), EKP ($4.37 \pm 2.09 \mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar ($3.13 \pm 1.59 \mu\text{mol/mg/min}$) no presentó diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$) lo que indica que ni la bebida azucarada ni el extracto de KP modificaron la actividad de la enzima. Contrario a lo anterior, el grupo azúcar-KP ($0.625 \pm 0.26 \mu\text{mol/mg/min}$) presentó una disminución de su actividad significativamente diferente ($p < 0.005$), de 6.225 unidades en diferencia al grupo control.

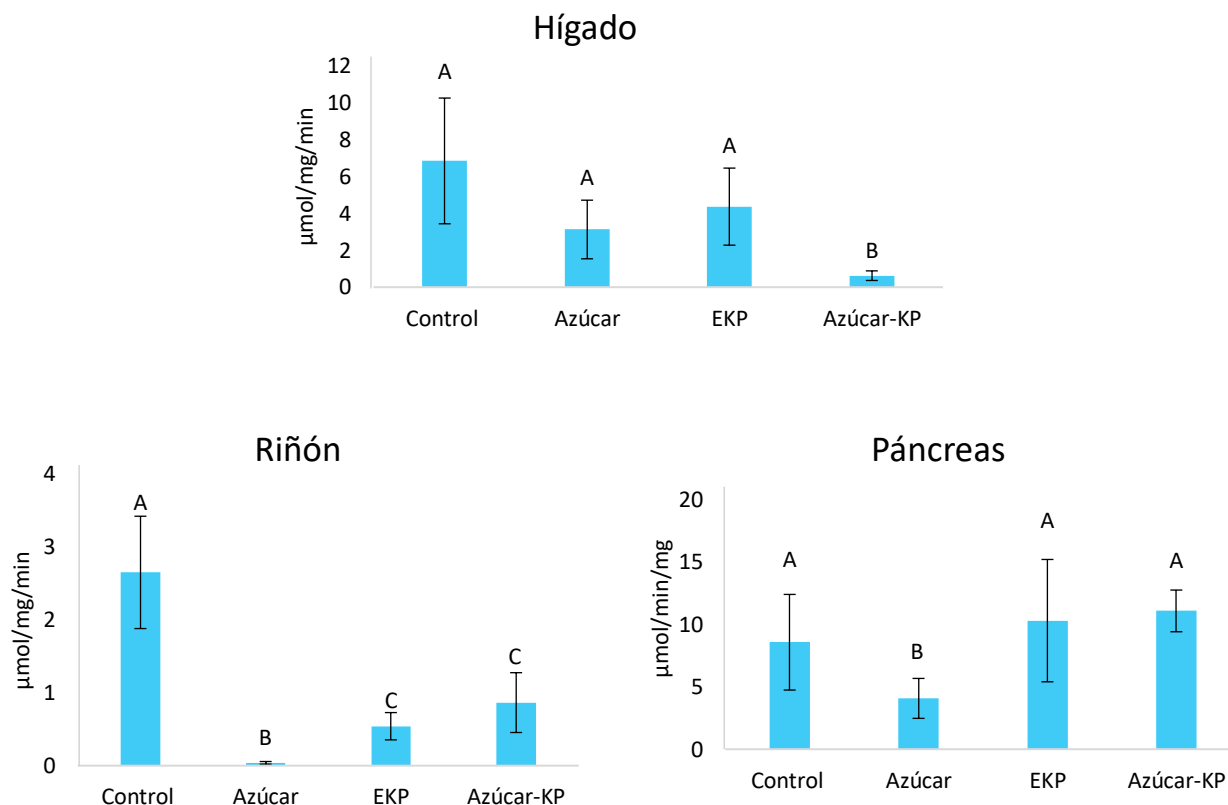


Figura 41. Actividad de la enzima Glutathión S-transferasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho tratadas con los diferentes esquemas. El análisis estadístico se realizó comparando la actividad de GST de los órganos de los grupos experimentales con el grupo control, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^a p \leq 0.05$, B, C.

En el hígado, la actividad de los grupos control (6.85 ± 3.41 $\mu\text{mol/mg/min}$), EKP (4.37 ± 2.09 $\mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar (3.13 ± 1.59 $\mu\text{mol/mg/min}$) no presentó diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$) lo que indica que ni la bebida azucarada ni el extracto de KP modificaron la actividad de la enzima. Contrario a lo anterior, el grupo azúcar-KP (0.625 ± 0.26 $\mu\text{mol/mg/min}$) presentó una disminución de su actividad significativamente diferente ($p < 0.005$), de 6.225 unidades en diferencia al grupo control. Este resultado puede indicar que alguno o algunos de los compuestos a los cuales se expusieron a los animales de este grupo, pudo ocasionar la inhibición de la actividad de la enzima posiblemente mediante la unión directa a la enzima o de forma indirecta mediante cualquier otro mecanismo.

En el riñón, los resultados obtenidos fueron los siguientes. La actividad de GST en el grupo control fue de 2.65 ± 0.007 $\mu\text{mol/mg/min}$ en el grupo azúcar 0.039 ± 0.018 $\mu\text{mol/mg/min}$; en el grupo EKP de 0.0541 ± 0.187 $\mu\text{mol/mg/min}$ y para el grupo azúcar-KP se obtuvo una actividad de 0.865 ± 0.041 $\mu\text{mol/mg/min}$. Se observó que la actividad de GST para el grupo expuesto a la solución de sacarosa disminuyó drástica y significativamente 2.61 unidades ($p > 0.05$) en comparación con el grupo control, indicando un efecto sobre la

enzima. Los grupos EKP y azúcar-KP presentaron una actividad enzimática de 0.011 y 0.826 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ respectivamente, mayor al grupo azúcar, pero menor al control. Eso indica que la exposición a azúcar, extracto de KP y azúcar-KP ocasionó una disminución en la actividad de GST.

La actividad de la GST en el páncreas del grupo del EKP ($10.3 \pm 4.9 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) y azúcar-KP ($11.08 \pm 1.67 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) no aumentaron significativamente en comparación con el grupo control ($8.57 \pm 3.83 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$), sin embargo, para el caso del grupo azúcar ($4.07 \pm 1.6 \mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$), la actividad de la GST disminuyó de manera significativa 4.5 unidades, respecto al grupo control. La disminución de la actividad de esta enzima en el páncreas pudo verse afectada por el exceso de azúcar al generar, posiblemente, un estado de estrés osmótico en el órgano.

Aunque la sacarosa en sí misma no interactúa directamente con la GST, los niveles de glucosa en el organismo pueden influir con la actividad de la enzima de varias maneras. Una de ellas es la influencia en los niveles de glutatión, ya que el consumo excesivo de sacarosa y otros CHOs simples pueden aumentar los niveles de glucosa en la sangre, lo que a su vez puede reducir los niveles de glutatión afectando la actividad de la GST.²¹⁰ Como ya se ha mencionado, el consumo excesivo de sacarosa y otros azúcares pueden aumentar la producción de radicales libres, y provocar estrés oxidativo el cual puede afectar la función de las enzimas, incluida la GST, al dañar su estructura o modificar su actividad,¹⁴ incluso algunas investigaciones han sugerido que el consumo de diversos tipos de azúcares puede tener efecto sobre la expresión genética y la regulación de las enzimas, los cuales pueden estar mediados por mecanismos epigenéticos, como modificaciones en la metilación del DNA, que pueden afectar la actividad y función de la GST.²¹¹

La GST pertenece a la familia de las enzimas conocidas como ligandinas, mismas que pertenecen a la fase II del metabolismo de los xenobióticos.²¹² Se ha observado que existen isoformas tanto en eucariontes como en procariontes estas proteínas poseen la capacidad de catalizar la conjugación del GSH a diversos sustratos electrofílicos con el propósito de llevar a cabo la detoxificación.^{213, 214} Esto podría ayudar a entender el porqué de los diferentes comportamientos en los órganos de estudio. Analizando los resultados obtenidos en la actividad de esta enzima se puede decir el estrés oxidativo ocasionado por las diferentes sustancias administradas a los animales no tiene relación con la actividad de GST. La figura 42 muestra la actividad de la enzima en los órganos de estudio bajo las diferentes condiciones de tratamiento.

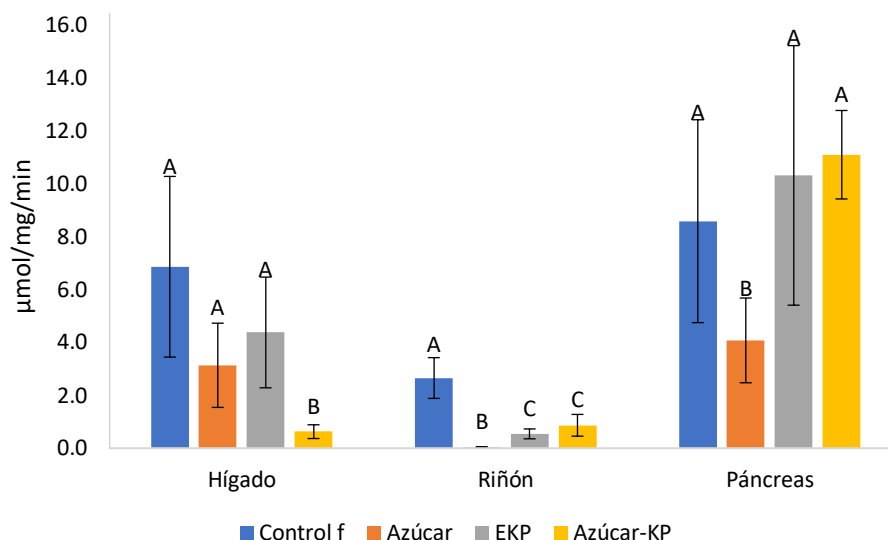


Figura 42. Comparación de la actividad de la GST en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=6), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C.

7.4.3 Catalasa

La figura 43 muestra la actividad de la catalasa en los órganos de estudio. La figura muestra que solo en el hígado se pudo observar un incremento de la actividad en los grupos EKP y azúcar-KP. Esto podría implicar que en riñón y en páncreas, así como en los grupos controles, no existen condiciones que generen la sobreproducción de peróxido de hidrógeno y por lo tanto la activación de la enzima.

En esta figura se puede observar que, en el hígado, el grupo tratado con KP tuvo una actividad 5.77 ± 2.48 mM/mg/min, la cual fue mayor significativamente al grupo control (2.77 ± 0.95 mM/mg/min). El grupo expuesto a la solución de azúcar (2.08 ± 0.99 mM/mg/min) presentó un comportamiento similar al grupo control sin cambios significativos. Por otro lado, el grupo azúcar-KP (3.9 ± 1.47 mM/mg/min) mostró una actividad mayor que el grupo control, pero menor que el grupo EKP. El incremento de la actividad de CAT en el grupo EKP podría estar relacionado con el efecto de los metabolitos presentes o los que se pudieron haber generado durante la exposición.

En el riñón y en el páncreas, no se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos. En el riñón se obtuvieron los siguientes resultados: control (3.26 ± 1.52 mM/mg/min), azúcar (3.34 ± 2.16 mM/mg/min); EKP (3.71 ± 1.52 mM/mg/min); azúcar-KP (2.54 ± 1.26 mM/mg/min). En el páncreas: control (2.16 ± 1.21 mM/mg/min), azúcar (3.4 ± 1.77 mM/mg/min); EKP (2.37 ± 1.13 mM/mg/min) y azúcar-KP (2.0 ± 1.0 mM/mg/min).

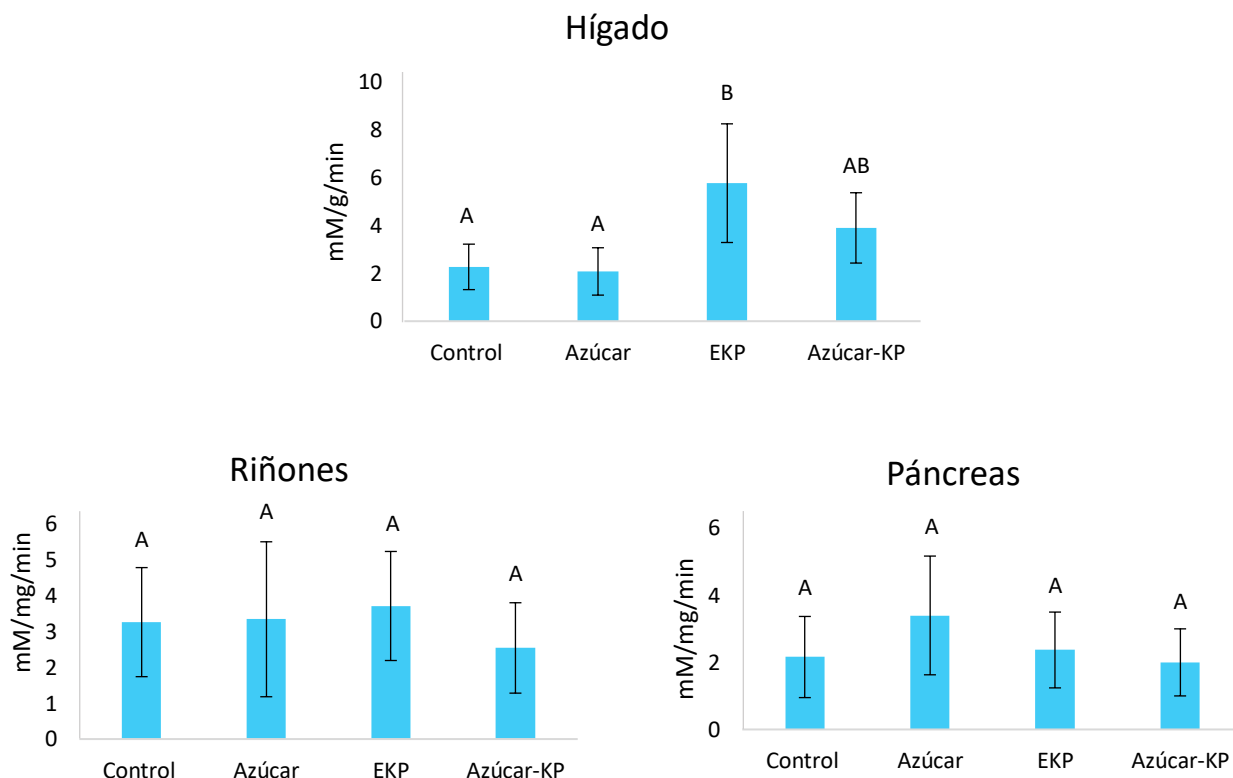


Figura 43. Actividad de la enzima Catalasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho tratadas con los diferentes esquemas. El análisis estadístico se realizó comparando la actividad de CAT de los órganos de los grupos experimentales con el grupo control, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, AB.

distribuida en el organismo, aunque su actividad varía en dependencia del tejido resultando más elevada en hígado y riñones, más baja en el tejido conectivo y epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular, se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra el citosol.²¹⁵ La CAT está involucrada en la destrucción de H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción, pero relativamente poca afinidad por el sustrato, además de presentar una función catalítica y otra peroxidativa.²¹⁶ Chance *et al.*, establecieron que la actividad de la CAT puede verse inhibida por el cianuro, la azida, el sulfuro, la hidroxilamina, el paracetamol, la bleomicina, la adriamicina y el paraquat.²⁰⁴ Diversos estudios establecen que la CAT tiene cierta afinidad por altas concentraciones de su sustrato, el H_2O_2 formado por la dismutación de la SOD. La alta concentración de H_2O_2 formado en las condiciones de hiperglicemia puede conducir a un incremento de la actividad de la CAT, lo que unido al aumento de la síntesis de proteínas como mecanismo de adaptación de las células frente al daño por H_2O_2 provoca un incremento de expresión de CAT, entre otras proteínas.^{217,218} La figura 44 muestra las actividades enzimáticas de los órganos en conjunto.

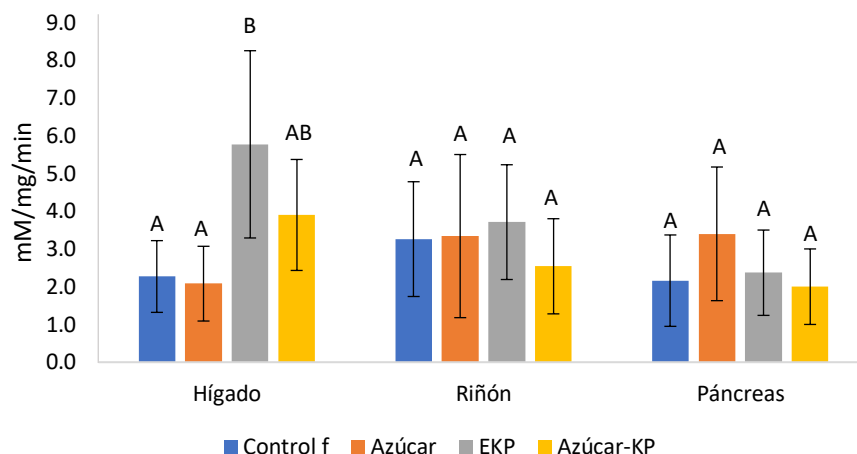


Figura 44. Comparación de la actividad de la CAT en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, AB.

7.4.4 Superóxido dismutasa

Para observar la actividad de esta enzima en los órganos de estudio se muestra la figura 45. Es notorio cómo la administración de la solución azucarada puede ocasionar el incremento de la actividad de esta enzima, en los tres órganos, a diferencia de lo observado en la actividad de las enzimas GST y CAT.

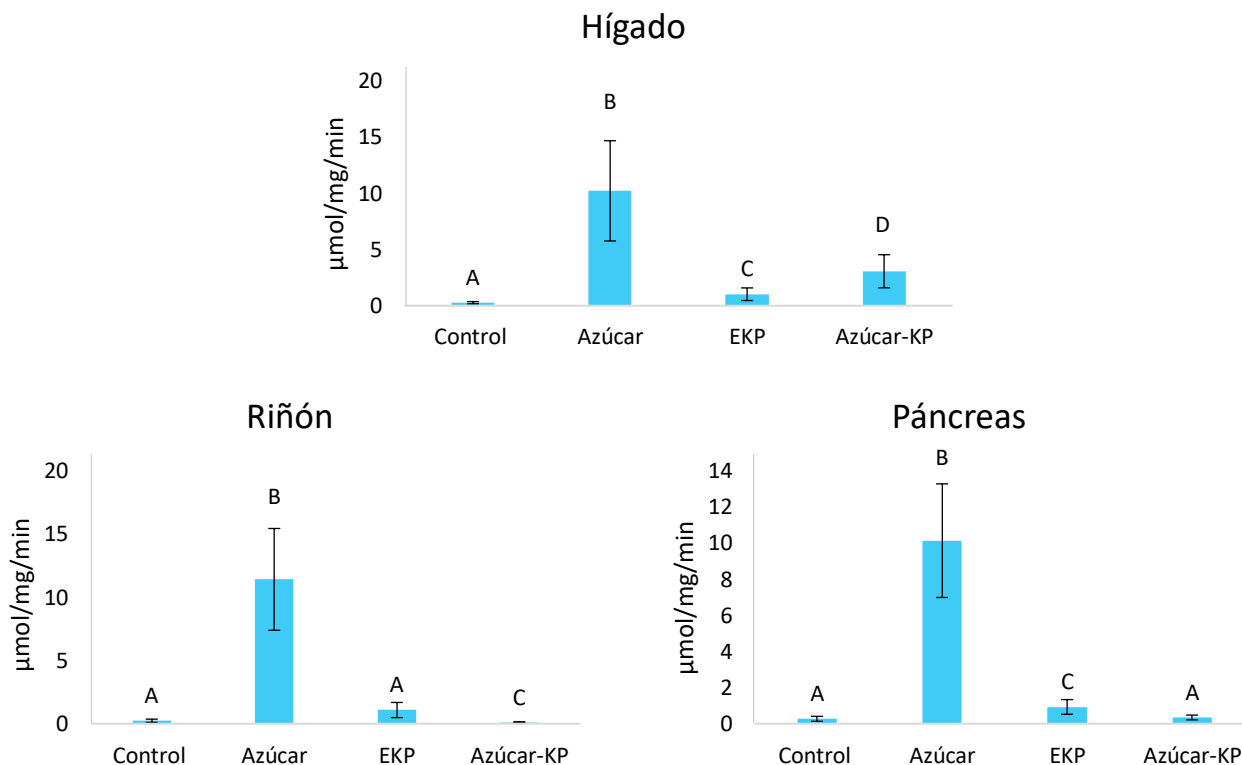


Figura 45. Actividad de la enzima SOD en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho. El análisis estadístico se realizó comparando la actividad de SOD de los órganos de los grupos experimentales con el grupo control, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey $p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C, D.

El hígado se obtuvieron los siguientes resultados, que son estadísticamente diferentes: control (0.265 ± 0.098 $\mu\text{mol/mg/min}$), azúcar (10.2 ± 4.45 $\mu\text{mol/mg/min}$); EKP (1.02 ± 0.56 $\mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar-KP (3.06 ± 1.47 $\mu\text{mol/mg/min}$). La administración de azúcar ocasionó un aumento de la actividad de 9.94 unidades de actividad. Cuando los roedores fueron tratados con el extracto crudo de la planta se observó un incremento de 0.76 unidades de actividad. El grupo tratado con la solución azucarada y tratado con el extracto de KP mostró una disminución de la actividad de 7.14 unidades en relación con el grupo expuesto a azúcar. Esta disminución no igualó los valores del control. A nivel renal los resultados obtenidos fueron los siguientes: control (0.235 ± 0.125 $\mu\text{mol/mg/min}$), azúcar (11.4 ± 4.02 $\mu\text{mol/mg/min}$), EKP (1.08 ± 0.6 $\mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar-KP (0.113 ± 0.0436 $\mu\text{mol/mg/min}$). De la misma forma que en el hígado la exposición a la solución azucarada produjo un aumento de la actividad. En este caso dicho incremento fue de 11.17 unidades de actividad. El extracto aumentó la actividad en 0.85 unidades. En este caso el tratamiento con el extracto de KP logró disminuir la actividad de SOD a niveles mayores a los del control. Finalmente, en el páncreas la actividad de SOD fue la siguiente: control (0.271 ± 0.138 $\mu\text{mol/mg/min}$), azúcar (10.12 ± 3.14 $\mu\text{mol/mg/min}$), EKP (0.927 ± 0.406 $\mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar-KP (0.345 ± 0.131 $\mu\text{mol/mg/min}$). La exposición a la solución de azúcar produjo un incremento en la actividad enzimática de 9.8 unidades, por su parte KP indujo un incremento de 0.71 unidades. El tratamiento con extracto de KP en ratas expuestas a la solución de azúcar logró normalizar la actividad de la enzima.

Los resultados indican que, en los tres órganos, el tratamiento a base de extracto de KP ayudó a disminuir la actividad de la enzima posiblemente debido a la capacidad antioxidante de los componentes presentes en las hojas de KP.

La SOD es una enzima antioxidante que se encuentra en las células de los organismos de los seres vivos. Su principal función es proteger a las células contra el estrés oxidativo, que puede ser causando por la acumulación de EROs.²¹⁹ La SOD cataliza la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Su actividad puede ser afectada por diversos factores, como la edad, el estrés, la exposición a toxinas y enfermedades.²²⁰ Algunos estudios sugieren que aumentar los niveles de SOD en el cuerpo podría tener beneficios para la salud, ya que podría ayudar a reducir el daño oxidativo y disminuir el riesgo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer.^{221,222}

En resumen, si bien la sacarosa en sí misma no afecta directamente las actividades de las enzimas antioxidantes, un consumo excesivo de azúcares simples puede contribuir al estrés oxidativo y afectar negativamente el equilibrio redox y el sistema antioxidante del organismo. Por otro lado, algunos metabolitos

secundarios, especialmente aquellos con propiedades prooxidantes, pueden afectar negativamente la actividad de la SOD. Estos compuestos pueden generar especies reactivas de oxígeno y aumentar la producción de radicales libres en el organismo, lo que puede comprometer la capacidad de la SOD para neutralizarlos de manera efectiva.²²³ Además, algunos estudios han sugerido que ciertos metabolitos secundarios pueden inhibir directamente la actividad de la SOD, interfiriendo con su función antioxidante.^{224,225} Es importante destacar que la influencia de los metabolitos secundarios en la actividad de la SOD puede variar dependiendo de la concentración, el tipo de metabolito y las condiciones específicas del organismo. La figura 46 muestra las actividades enzimáticas en los tres órganos de estudio en conjunto.

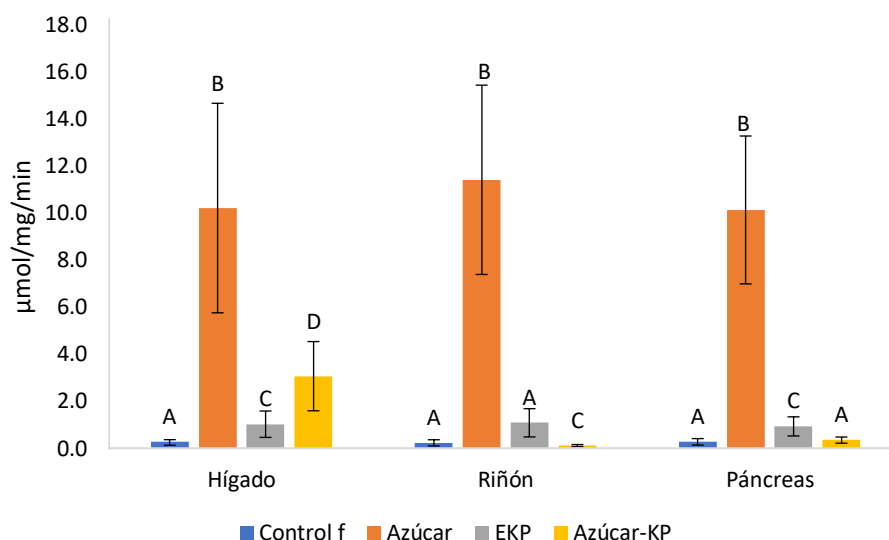


Figura 46. Comparación de la actividad de la SOD en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^{\wedge}p \leq 0.05$, B, C, D.

7.4.5 Citocromo-C oxidasa

La figura 47 y la tabla 21 muestra los resultados obtenidos en la determinación del comportamiento de la enzima Citocromo C-oxidasa en los órganos.

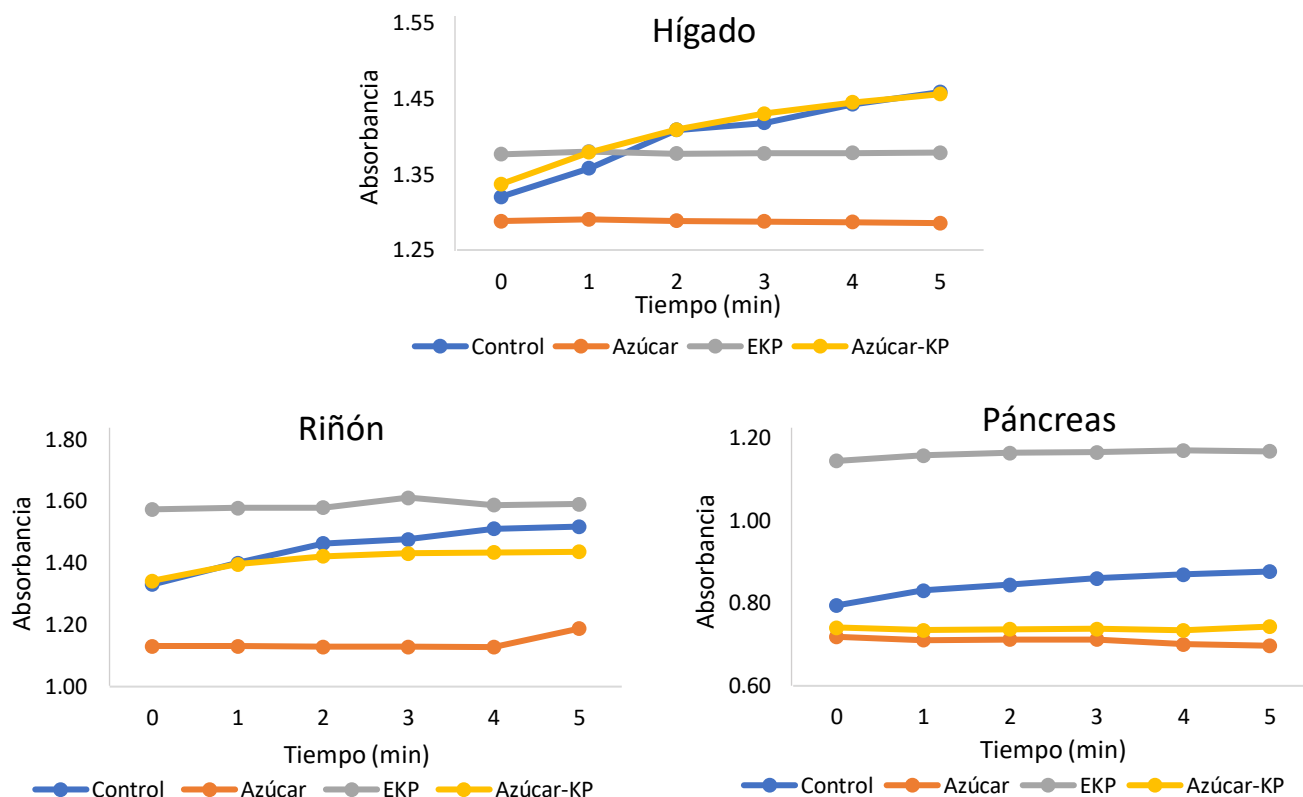


Figura 47. Actividad de Citocromo C-oxidasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho.

En el caso de esta enzima, la evaluación de su actividad se hace determinando la absorbancia mediante ensayos espectrofotométricos, monitoreando el cambio de los valores de absorción de la muestra a una longitud de onda de 590 nm. Esto se debe a que la citocromo-c oxidasa reduce el oxígeno molecular y, a su vez, oxida el citocromo-c, lo que resulta en un cambio en la absorbancia de la muestra a lo largo del tiempo.¹²⁸ La velocidad de cambio en la absorbancia está relacionada con la actividad enzimática.^{226,227}

Se muestran las tablas de datos debido a que en las gráficas no se pusieron por el espacio que ocupan y que ocasiona traslape entre las líneas.

Tabla 21. Actividad de Citocromo C-oxidasa en riñón, hígado y cerebro de ratas macho Wistar. Los resultados muestran la $X \pm SD$ de $n=6$. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

a) Riñón				
Tiempo (min)	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
0	1.33 ± 0.06^A	1.13 ± 0.14^A	1.57 ± 0.22^A	1.34 ± 0.04^A
1	1.40 ± 0.06	1.13 ± 0.14	1.58 ± 0.23	1.40 ± 0.02
2	1.46 ± 0.05	1.13 ± 0.14	1.58 ± 0.23	1.42 ± 0.02
3	1.48 ± 0.09	1.13 ± 0.14	1.61 ± 0.26	1.43 ± 0.02
4	1.51 ± 0.03	1.13 ± 0.14	1.59 ± 0.23	1.43 ± 0.02
5	1.52 ± 0.03^B	1.19 ± 0.31^B	1.59 ± 0.23^B	1.44 ± 0.02^B

b) Hígado				
Tiempo (min)	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
0	1.32 ± 0.12^A	1.29 ± 0.10^A	1.38 ± 0.23^A	1.34 ± 0.05^A
1	1.36 ± 0.09	1.29 ± 0.10	1.38 ± 0.23	1.38 ± 0.03
2	1.41 ± 0.08	1.29 ± 0.10	1.38 ± 0.23	1.41 ± 0.02
3	1.42 ± 0.07	1.29 ± 0.10	1.38 ± 0.23	1.43 ± 0.01
4	1.44 ± 0.06	1.29 ± 0.10	1.38 ± 0.23	1.45 ± 0.01
5	1.46 ± 0.05^B	1.29 ± 0.10^A	1.38 ± 0.23^A	1.46 ± 0.01^A

c) Páncreas				
Tiempo (min)	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$	$X \pm SD$
0	0.79 ± 0.16^A	0.72 ± 0.22^A	1.14 ± 0.20^A	0.74 ± 0.26^A
1	0.83 ± 0.18	0.71 ± 0.23	1.16 ± 0.19	0.73 ± 0.26
2	0.84 ± 0.19	0.71 ± 0.22	1.16 ± 0.19	0.74 ± 0.25
3	0.86 ± 0.20	0.71 ± 0.21	1.16 ± 0.19	0.74 ± 0.25
4	0.87 ± 0.20	0.70 ± 0.21	1.17 ± 0.19	0.73 ± 0.25
5	0.88 ± 0.20^A	0.70 ± 0.21^A	1.17 ± 0.19^A	0.74 ± 0.24^A

En el riñón, bajo condiciones normales se observó aumento en la absorbancia en función del tiempo, indicando la actividad normal de la enzima. Entre el punto inicial y el final se observó un aumento significativo de 0.19 unidades. La exposición a la solución azucarada y al extracto de KP mostró que no hubo actividad enzimática, ya que no existió aumento significativo en sus absorbancias. El grupo expuesto a azúcar y tratado con el extracto acuoso de KP mostró un comportamiento parecido al grupo control. El hígado presentó actividad normal y la diferencia significativa entre el punto inicial y el final fue de 0.14 unidades. De la misma manera que el riñón, los grupos azúcar y EKP mostraron una nula actividad enzimática, mientras que el grupo azúcar-KP tuvo una tendencia a aumentar la concentración, pero de forma no significativa. Cuando se analizó la actividad de la enzima en el páncreas se encontró que el grupo control mostró una tendencia a aumentar

sus valores de absorbancia, pero sin significancia estadística. Lo mismo sucedió en los tres grupos experimentales.

La literatura indica que la enzima resulta crucial para el transporte de electrones, debido a que los fija al oxígeno encargado de captar a los electrones transportados. Se ha reportado que, sin oxígeno, la enzima no funciona correctamente y eventualmente el mecanismo de la CTE se detiene, provocando una acidificación mitocondrial y a su vez, un desequilibrio en el potencial de la membrana provocando muerte celular.^{228,229} Los resultados indicaron que en hígado y riñón, la exposición a las soluciones de azúcar y de extracto, inhibieron la actividad enzimática, lo cual podría indicar dos cosas: la primera un daño a los sistemas de transporte y por ello a la formación de oxígeno y por ende a la síntesis de ATP, lo que eventualmente ocasionaría daños severos en los animales. Sin embargo, los roedores siguen viviendo a lo largo de todo el tiempo de exposición. La segunda cosa que pueden indicar los resultados es que ambas soluciones inhiben la actividad de la enzima debido a los componentes de la misma. No se sabe en realidad cual es el mecanismo de daño, pero lo que llama la atención es que cuando las ratas son expuestas a azúcar y tratadas con el extracto crudo la actividad de la enzima se restablece. Posiblemente el extracto sea antagonista de los daños de la solución y por ello se recupere la actividad.

No existen referencias que se relacionen con estas observaciones en la literatura, sin embargo, se sabe que la sacarosa y la enzima Citocromo-c oxidasa están vinculadas en el metabolismo energético de los organismos. La sacarosa es una molécula de relevancia nutricional que se descompone en glucosa y fructosa gracias a enzimas específicas en el tracto digestivo.¹⁷ Estos monosacáridos pueden ser empleados por las células como fuentes de energía mediante rutas metabólicas, como la glucólisis y la respiración celular.¹⁹ En este sentido, la sacarosa puede proporcionar los monosacáridos necesarios para la generación de energía a través de la respiración celular, en donde la citocromo-c oxidasa desempeña un papel crucial.¹³³ Aunque no existe una interacción directa entre ambas moléculas en cuanto a función o regulación, su relación radica en la contribución de la sacarosa como fuente de combustible para la actividad de la citocromo-c oxidasa en el proceso respiratorio.

En relación con el extracto crudo de KP, diversos estudios han sugerido que ciertos metabolitos secundarios pueden interactuar con la actividad de la citocromo-c oxidasa y afectar su funcionamiento. Por ejemplo, algunos polifenoles pueden inhibir la actividad de la enzima al interactuar con su sitio activo o modificar su conformación.^{230, 231} Esto puede tener implicaciones en la generación de energía celular y en procesos metabólicos asociados. Además, algunos metabolitos secundarios pueden tener efectos directos o indirectos sobre la expresión génica, incluyendo genes relacionados con la síntesis y regulación de la citocromo-c

oxidasa. Estas interacciones pueden influir en la cantidad y actividad de la enzima, y, por lo tanto, en la eficiencia de la cadena de transporte de electrones y la producción de ATP.²³² Es importante destacar que la relación entre los metabolitos secundarios y la citocromo-c oxidasa no es universal y puede depender de múltiples factores, como la concentración y la estructura química de los compuestos, así como la especie y el contexto biológico en el que se encuentran. Se requiere una investigación adicional para comprender mejor estas interacciones y sus implicaciones fisiológicas.

7.5 Ensayos bioquímicos en ratas wistar hembra

Las ratas presentan niveles de estrés oxidativo diferentes en función del sexo al ser expuestas a xenobióticos.^{233,234}

7.5.1 Especies reactivas de oxígeno

La figura 48 muestra los resultados obtenidos en los tres órganos de estudio en ratas hembra expuestas a los tres tratamientos. El comportamiento observado indica que hígado y riñón son semejantes, mientras que en páncreas el comportamiento difiere.

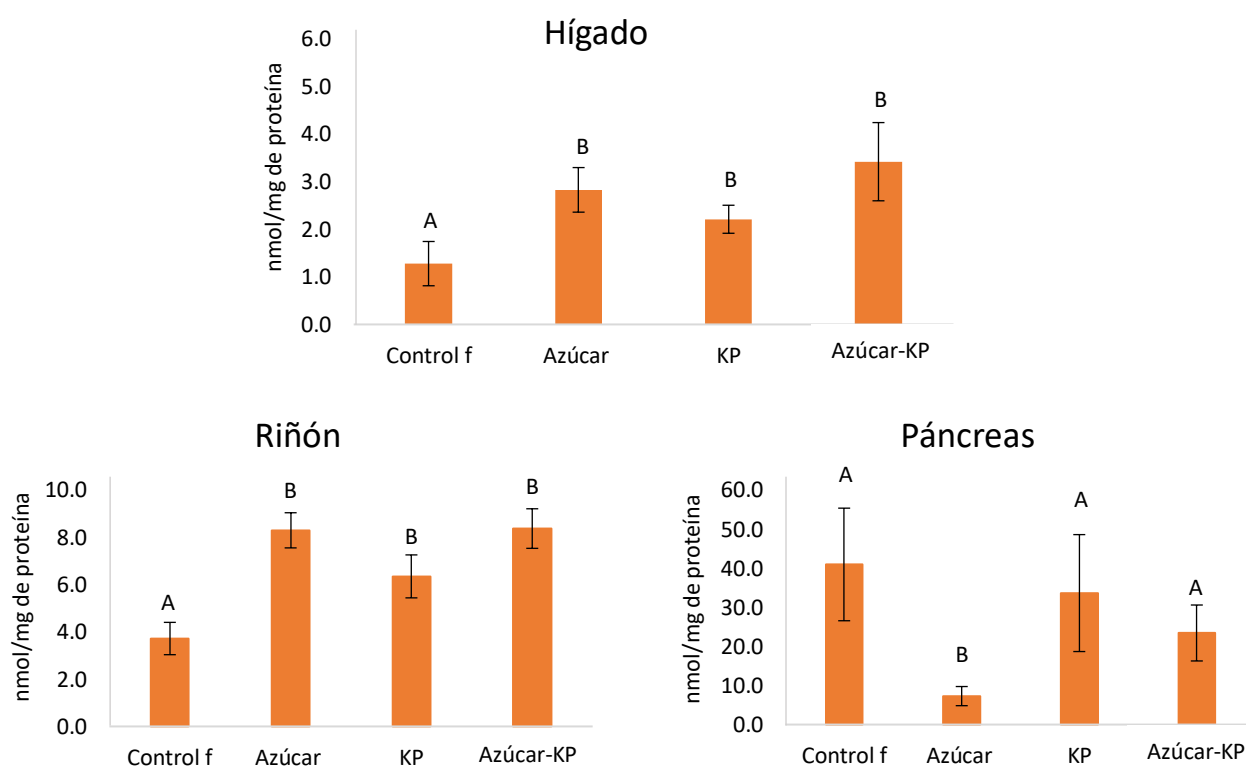


Figura 48. Especies reactivas de oxígeno en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra, expuestas a los diferentes esquemas de tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando las concentraciones de EROs en los órganos de los grupos experimentales, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B.

Los resultados obtenidos en el hígado fueron los siguientes: el control (1.27 ± 0.46 nmol/mg de proteína), azúcar (2.82 ± 0.46 nmol/mg de proteína); EKP (2.21 ± 0.29 nmol/mg de proteína) y azúcar-KP (3.42 ± 0.82 nmol/mg de proteína). Los grupos experimentales mostraron un aumento de actividad estadísticamente diferente en relación con el grupo control. Los aumentos fueron de 1.01, 0.94 y 2.15 unidades respectivamente. Esto indica que en este órgano las tres condiciones generaron especies reactivas de oxígeno y que la combinación de las soluciones de azúcar y extracto acuoso de KP fueron las que más las

incrementaron. En el riñón, los resultados obtenidos fueron los siguientes: control (3.71 ± 0.68 nmol/mg de proteína), azúcar (8.3 ± 0.74 nmol/mg de proteína); extracto acuoso de hojas de KP (6.34 ± 0.9 nmol/mg de proteína) y azúcar-KP (8.36 ± 0.83 nmol/mg de proteína). Los incrementos en la concentración de EROs fueron de 4.51, 3.24 y 4.55 unidades respectivamente y en relación con el control. El páncreas presentó un comportamiento diferente. El grupo control mostro una actividad de 40.96 ± 14.40 nmol/mg de proteína. Esta actividad disminuyo hasta 7.3 ± 2.44 nmol/mg de proteína (33.66 unidades) cuando los animales fueron expuestos a la solución de azúcar, la administración de extracto crudo y la exposición a azúcar y extracto se comportaron de forma parecida al grupo control.

En el caso del páncreas de especies hembras, algunos estudios han sugerido que la producción de EROs puede estar influenciada por hormonas sexuales como el estrógeno y la progesterona. Se ha propuesto que el estrógeno puede aumentar la producción de EROs en el páncreas, lo cual podría estar relacionado con la mayor susceptibilidad de las hembras a ciertas enfermedades pancreáticas, como la pancreatitis.^{235, 236} Además, los cambios hormonales durante el ciclo menstrual pueden afectar los niveles de EROs en el páncreas. Otros aspectos como los factores hormonales, pueden influir en la producción de EROs en el páncreas femenino. Por ejemplo, la presencia de condiciones como la diabetes tipo 2 o la obesidad puede aumentar la producción de EROS debido a la disfunción metabólica y la inflamación crónica asociada.²³⁷

Se ha publicado que la producción de EROs en el páncreas de organismos femeninos puede tener implicaciones tanto en la función normal del órgano como en la aparición de enfermedades pancreáticas. El estrés oxidativo causado por un aumento en la producción de EROS puede dañar las células pancreáticas, comprometiendo la producción de insulina y contribuyendo al desarrollo de enfermedades como la diabetes. La producción de EROs en hembras, puede verse influenciada por una serie de factores hormonales y metabólicos propios del sistema reproductivo femenino. Durante el ciclo menstrual, por ejemplo, los niveles fluctuantes de hormonas como el estrógeno y la progesterona pueden afectar la producción de EROs.⁴⁹ Se ha sugerido que niveles más altos de estrógeno pueden aumentar la producción de ROS, especialmente durante la fase preovulatoria. Factores hormonales, otras condiciones y enfermedades específicas pueden influir en la producción de EROs en las mujeres. Por ejemplo, ciertas enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico (SOP) y la endometriosis pueden estar asociadas con un aumento en la producción de ROS debido a desequilibrios hormonales y procesos inflamatorios.²³⁸ La figura 49 muestra las actividades enzimáticas en los tres órganos de estudio en conjunto.

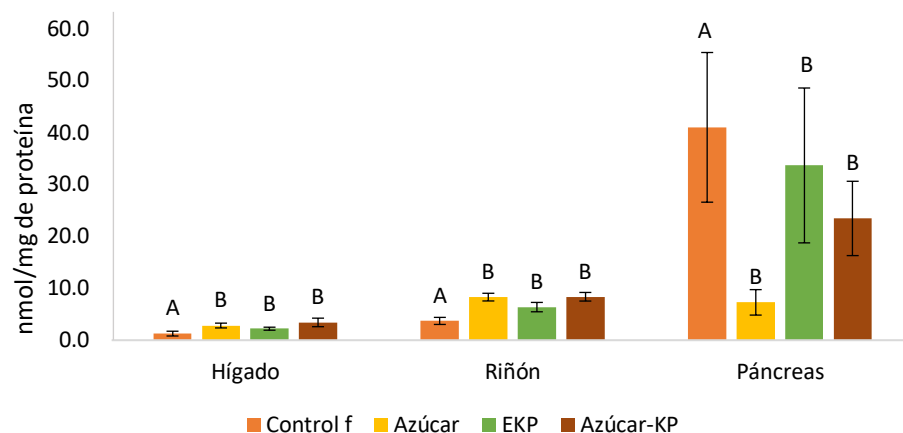


Figura 49. Comparación de EROs en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C.

7.5.2 Glutación-S Transferasa

La figura 50 muestra los resultados que se obtuvieron para la enzima GST. Los resultados muestran que los comportamientos de la enzima fueron diferentes en cada órgano. De la misma forma las diferencias existieron entre machos y hembras.

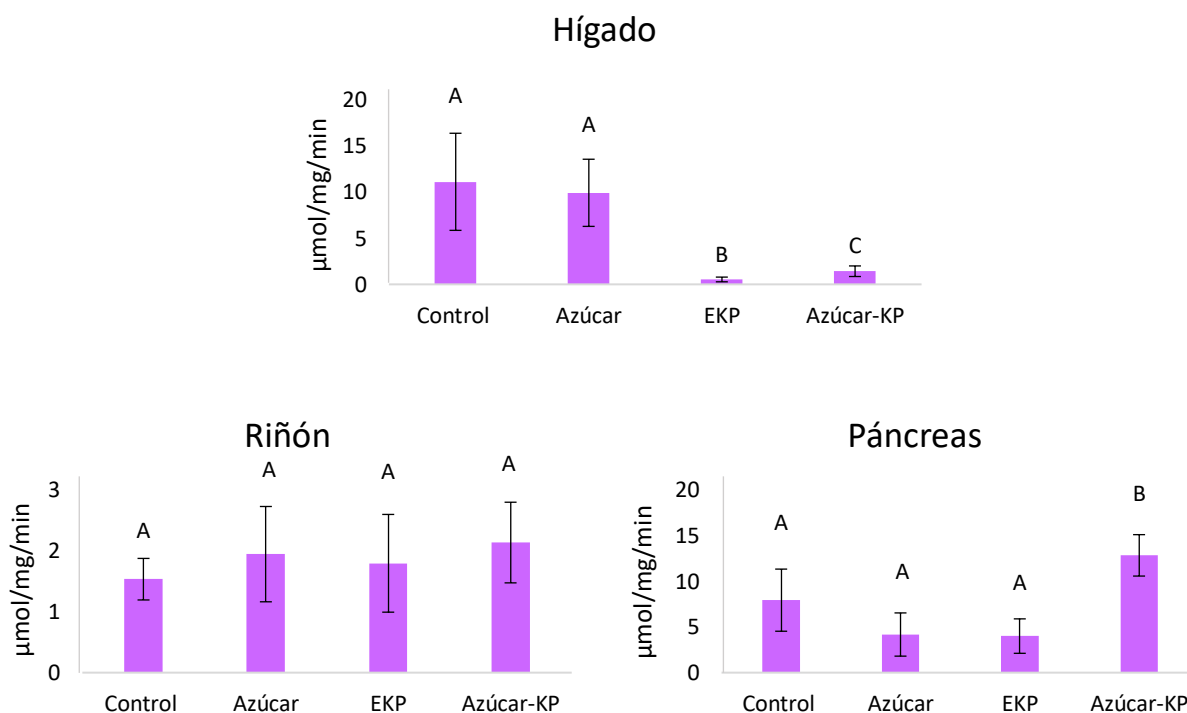


Figura 50. Actividad de la Glutación-S transferasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra, expuestas a los diferentes esquemas de tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando la actividad de GST de los órganos de los grupos experimentales con el grupo control, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C.

En el hígado se vio que en condiciones control, la actividad de la enzima fue de $11.09 \pm 5.25 \mu\text{mol/mg/min}$. Cuando los animales fueron expuesto a la solución de azúcar, la actividad fue de $9.9 \pm 3.63 \mu\text{mol/mg/min}$, actividad que no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos. La presencia del extracto crudo de KP ($0.53 \pm 0.25 \mu\text{mol/mg/min}$) ocasionó una disminución de 10.56 unidades en relación con los dos grupos anteriores. Cuando las ratas expuestas a azúcar fueron tratadas con extracto de KP, la actividad obtenida fue de $1.42 \pm 0.57 \mu\text{mol/mg/min}$, la cual es mayor en relación con el grupo EKP, pero menor al control y al grupo azúcar. Estos resultados podrían explicarse asumiendo que, posiblemente, el azúcar no se ve implicada en el metabolismo de los xenobióticos, ni inhibe la actividad de esta enzima, es por ello que la actividad de la GST se comporta de igual manera que en el grupo control. Caso contrario del grupo expuesto al extracto acuoso de las hojas de KP, en donde se observó que la actividad disminuyó, posiblemente debido a la mezcla de metabolitos presentes los cuales funcionan como barrera antioxidante contra los agentes externos o inhiben la actividad de esta enzima. La actividad enzimática de la GST está influenciada indirectamente por la concentración de azúcar y de metabolitos presentes, por lo que en el sistema competitivo azúcar-KP la disminución de podría basar en que el efecto de los metabolitos en la GST es superior a los diversos factores que atribuyen la funcionalidad de la GST. En el riñón, el comportamiento fue diferente al del hígado. En este caso la actividad encontrada en los grupos fue la siguiente: control ($1.53 \pm 0.34 \mu\text{mol/mg/min}$), azúcar ($1.94 \pm 0.78 \mu\text{mol/mg/min}$); EKP ($1.79 \pm 0.8 \mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar-KP ($0.865 \pm 0.41 \mu\text{mol/mg/min}$). Estos resultados indican que no hay variación significativa en la actividad enzimática. En el páncreas solo el grupo azúcar-KP presento un incremento significativo en comparación con el grupo control ($12.8 \pm 2.26 \mu\text{mol/mg/min}$ vs $7.91 \pm 3.39 \mu\text{mol/mg/min}$ respectivamente), lo que indicó un incremento de 4.89 unidades. Los grupos azúcar ($4.16 \pm 2.36 \mu\text{mol/mg/min}$) y al grupo EKP ($3.99 \pm 1.88 \mu\text{mol/mg/min}$) no mostraron diferencias en la actividad entre ellos y comparándolas con el control.

Se ha observado que los estrógenos, una clase de hormonas femeninas, pueden regular la expresión y actividad de la GST en diferentes tejidos y condiciones. En algunos estudios, se ha encontrado que los estrógenos pueden aumentar la actividad de la GST en tejidos específicos, como el hígado y los riñones. Sin embargo, los efectos de los estrógenos en la GST pueden variar dependiendo del tipo de tejido y las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, se ha observado que los estrógenos pueden tener efectos opuestos en la actividad de la GST en los tejidos mamarios. En algunos casos, los estrógenos pueden aumentar la actividad enzima de dicha enzima, lo que puede tener un efecto protector contra el estrés oxidativo y la formación de agentes carcinógenos.^{239,240} La figura 51 muestra las actividades enzimáticas en los tres órganos de estudio en conjunto.

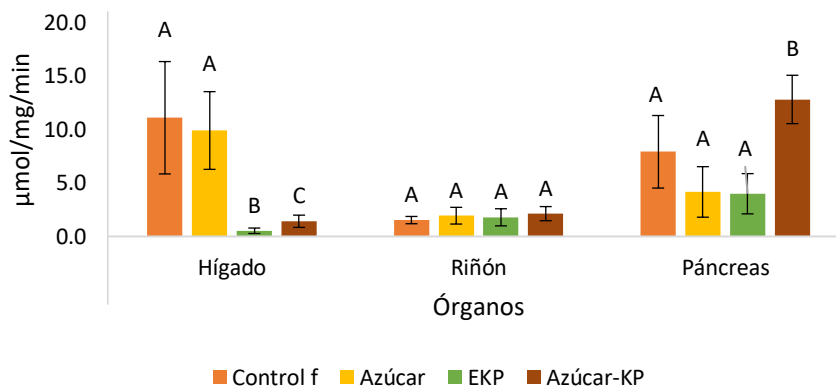


Figura 51. Comparación de la actividad de la GST en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^Ap \leq 0.05$, B, C

7.5.3 Catalasa

La figura 52 muestra los resultados obtenidos. En este caso la actividad medida en todos los órganos se comportó de la misma manera, aun cuando existieron tendencias a subir y bajar, el análisis estadístico mostró que no existieron diferencias.

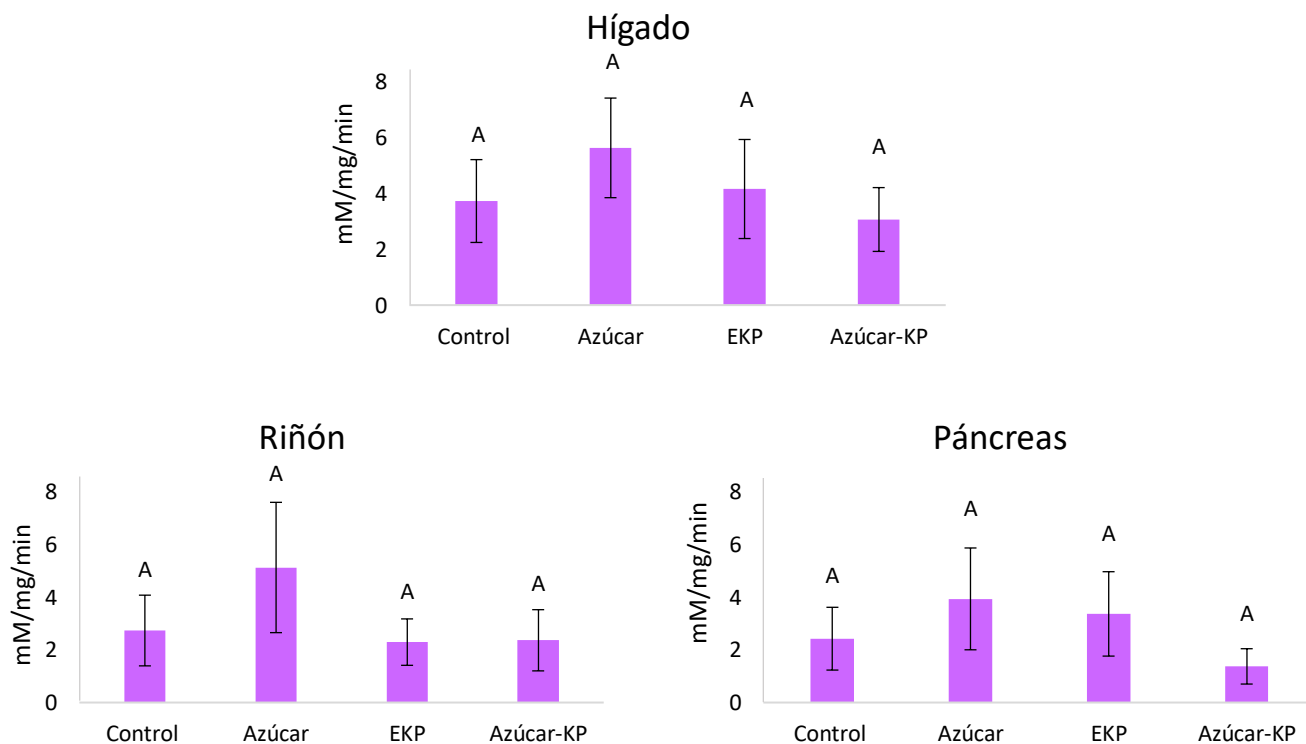


Figura 52. Actividad de la enzima catalasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra bajo los diferentes esquemas de tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando la actividad de CAT de los órganos de los grupos experimentales con el grupo control, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^Ap \leq 0.05$, B.

La actividad de catalasa en el hígado de los diferentes grupos de experimentación fue la misma. Los datos obtenidos fueron los siguientes: (3.72 $\pm$ 1.48 mM/mg/min); azúcar (5.62 $\pm$ 1.78 mM/mg/min); EKP (4.15 $\pm$ 1.77 mM/mg/min) y azúcar-KP (3.06 $\pm$ 1.14 mM/mg/min). En el riñón, la de los grupos fue: control (2.73 $\pm$ 1.34 mM/mg/min); azúcar (5.12 $\pm$ 2.47 mM/mg/min); EKP (2.29 $\pm$ 0.88 mM/mg/min); azúcar-KP (2.36 $\pm$ 1.16 mM/mg/min). Para el páncreas las actividades medidas dieron los siguientes resultados: control (2.42 $\pm$ 1.19 mM/mg/min); azúcar (3.39 $\pm$ 1.93 mM/mg/min); EKP (3.36 $\pm$ 1.6 mM/mg/min); azúcar-KP (1.37 $\pm$ 0.67 mM/mg/min).

En diferentes órganos, la actividad de la enzima CAT puede estar influenciada por varios factores, incluyendo las hormonas femeninas y las condiciones fisiológicas específicas.²⁴¹ Sin embargo, la investigación sobre la influencia directa de las hormonas femeninas en la actividad de la CAT es limitada y los resultados son contradictorios. Algunos estudios sugieren que los estrógenos pueden tener efectos protectores y aumentar la actividad de la CAT. Se ha observado que los estrógenos pueden regular la expresión génica de la CAT y aumentar su actividad en el riñón e hígado, lo que podría aplicarse también al páncreas. Además, se ha encontrado que los estrógenos pueden tener efectos antiinflamatorios y antioxidantes, lo que podría contribuir a la regulación positiva de la actividad de la CAT^{242,243}. Por otro lado, algunos estudios han sugerido que los estrógenos podrían tener efectos negativos en la actividad de la CAT en el páncreas femenino. Se ha observado que los estrógenos pueden aumentar la producción de EROs en el páncreas, lo que podría desencadenar estrés oxidativo y reducir la actividad de la CAT.²⁴⁴ La figura 53 muestra las actividades enzimáticas en los tres órganos de estudio en conjunto.

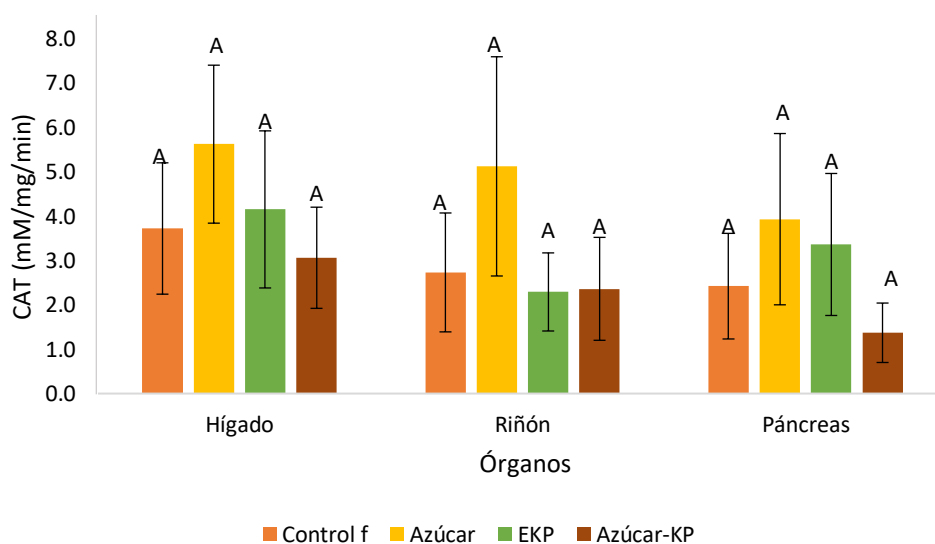


Figura 53. Comparación de la actividad de la CAT en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=6), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^{\Delta}p \leq 0.05$, B, C

7.5.4 Superóxido dismutasa

La figura 54 muestra los resultados en hígado, riñón y páncreas. Se puede observar que el comportamiento de la enzima en los tres órganos fue completamente diferente entre ellos y al compararlos con los de los machos.

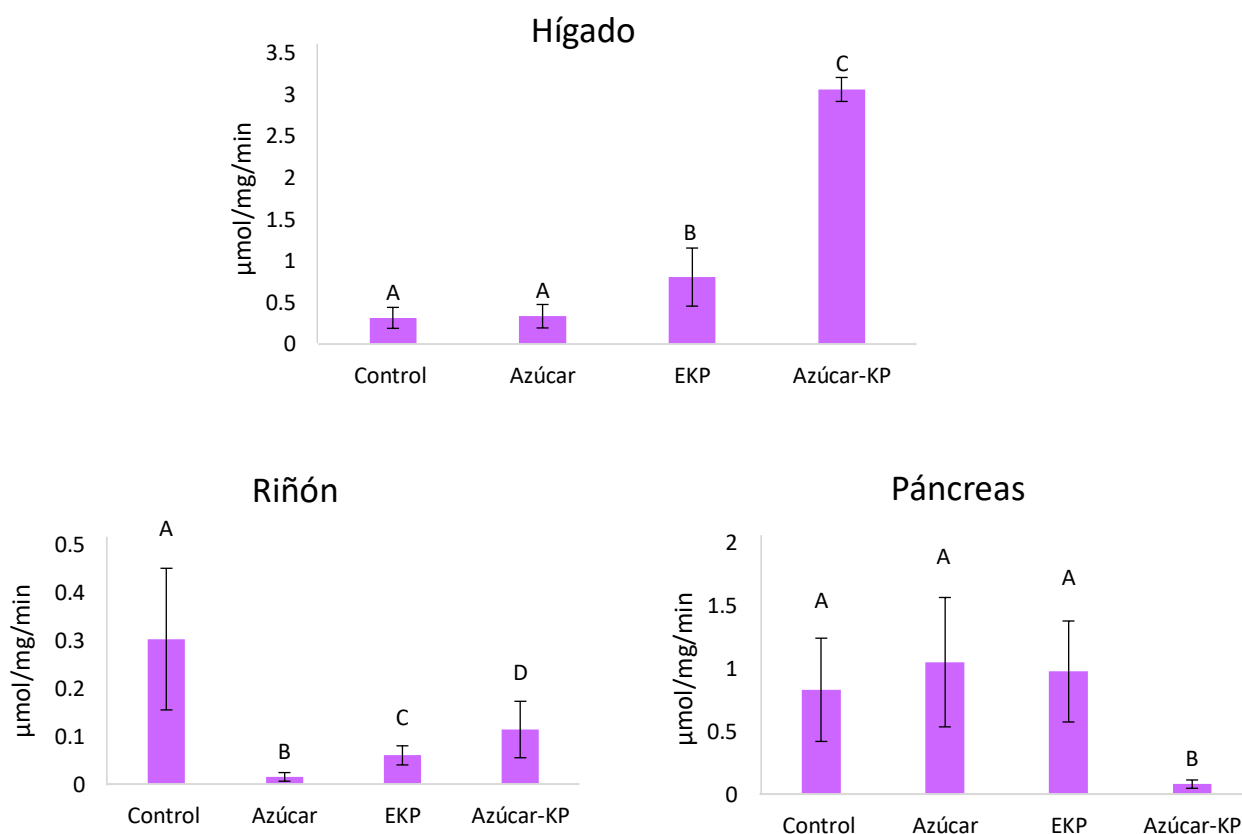


Figura 54. Actividad de la enzima SOD en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra bajo los diferentes esquemas de tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando la actividad de SOD de los órganos de los grupos experimentales con el grupo control, utilizando un ANOVA de una vía y una comparación de Tukey ($p < 0.05$). El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A p \leq 0.05$, B, C.

En hígado, los resultados fueron los siguientes: control ($0.31 \pm 0.12 \mu\text{mol/mg/min}$), azúcar ($0.33 \pm 0.14 \mu\text{mol/mg/min}$), grupo EKP ($0.81 \pm 0.349 \mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar-KP ($3.06 \pm 0.14 \mu\text{mol/mg/min}$). Estos datos indican que la exposición a azúcar en solución no causa un cambio en la actividad de la enzima al compararla con el grupo control, mientras que los grupos EKP y azúcar-KP mostraron un incremento significativo de 0.5 y 2.75 unidades en relación con el grupo control. La combinación de las dos soluciones produjo el mayor incremento de la actividad de la enzima, indicando que, posiblemente, se generaron condiciones que favorecieron la formación de los radicales superóxido, incrementando, en este caso, el estrés oxidativo. En cuanto a los riñones, se observó que la actividad de la enzima disminuyó cuando los animales fueron expuestos a los tres esquemas experimentales. La actividad determinada para cada grupo fue la siguiente:

control ($0.3 \pm 0.14 \mu\text{mol/mg/min}$, azúcar ($0.015 \pm 0.009 \mu\text{mol/mg/min}$), EKP ($0.06 \pm 0.02 \mu\text{mol/mg/min}$) y azúcar-KP ($0.11 \pm 0.06 \mu\text{mol/mg/min}$). Esto significa que la exposición a la solución azucarada indujo una disminución de 50% de la actividad de la enzima, de 0.24 unidades para el grupo EKP y de 0.19 unidades para el grupo azúcar-EKP, la actividad registrada fue de $0.08 \pm 0.03 \mu\text{mol/mg/min}$, indicando una disminución significativa de 0.22 unidades. Para el páncreas, los resultados fueron los siguientes: control ($0.83 \pm 0.41 \mu\text{mol/mg/min}$); azúcar ($1.05 \pm 0.51 \mu\text{mol/mg/min}$); EKP ($0.97 \pm 0.4 \mu\text{mol/mg/min}$). Estos datos indicaron que no hubo diferencia significativa y por ello la actividad enzimática no sufrió cambios cuando los roedores fueron expuestos por separado a las soluciones de azúcar y extracto de KP. Sin embargo, cuando las ratas fueron expuestas a azúcar y tratadas con extracto ($0.08 \pm 0.03 \mu\text{mol/mg/min}$) se registró la disminución de la actividad de la enzima de 0.75 unidades.

La sacarosa ha demostrado tener un comportamiento normal en la enzima SOD a nivel hepático y pancreático, sin embargo, puede que inhiba la acción de esta misma a nivel renal es por ello que, se observó una disminución de su actividad al momento de evaluarse. La presencia de los metabolitos de las hojas de KP en el hígado generan un aumento de la actividad de SOD debido a que algunos de los metabolitos pueden ser prooxidantes y estén generando EROs lo cual aumenta la actividad de la SOD, a nivel renal esta actividad disminuye, esto posiblemente podría deberse a que los metabolitos actúan como barrera antioxidante acaparando las EROs presentes en el metabolismo generando una inactivación de la enzima y comportándose de forma formal a nivel pancreático. La combinación de estos sistemas genera un aumento de actividad enzimática a nivel hepático, debido posiblemente a la generación de EROS, en los mecanismos anteriormente explicados. A nivel pancreático, esta actividad baja posiblemente debido a la presencia de los metabolitos antioxidantes de KP o algún otro factor hormonal que afecte la funcionalidad de la enzima. Por otro lado, se ha observado que hormonas como los estrógenos pueden aumentar la expresión de la SOD en tejidos como el hígado, los vasos sanguíneos y los tejidos reproductivos en modelos animales y en estudios in vitro, lo que sugiere que estas hormonas pueden tener un efecto protector en el metabolismo femenino al aumentar la capacidad antioxidante y ayudar a neutralizar los radicales libres. Además, otros factores como la dieta y el estilo de vida pueden afectar la producción y la actividad de la SOD. Una dieta rica en antioxidantes, como vitaminas C y E, y minerales como el zinc y el cobre, puede aumentar la actividad de la SOD y mejorar la capacidad antioxidante en general.²⁴⁵⁻²⁴⁷ La figura 55 muestra las actividades enzimáticas en los tres órganos de estudio en conjunto.

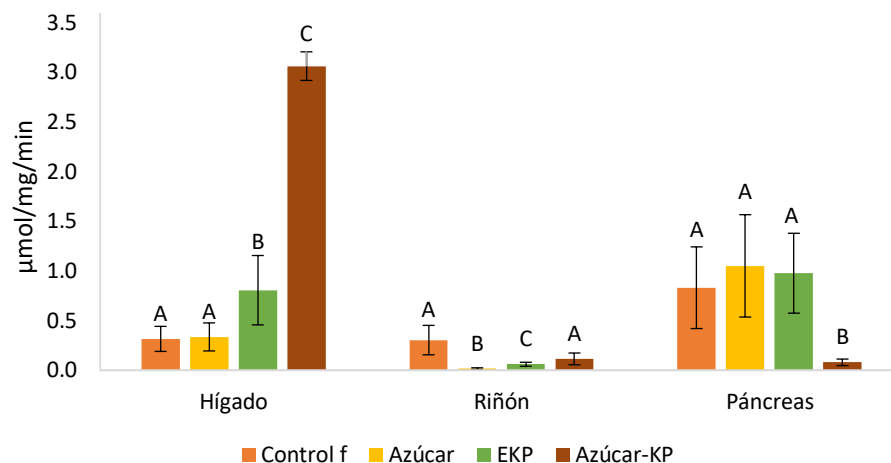


Figura 55. Comparación de la actividad de SOD en los tres órganos de estudio. El promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=6$), que no comparten una letra son significativamente diferentes $^A P \leq 0.05$, B, C

7.5.5 Citocromo-C oxidasa

La figura 56 y la tabla 23 muestran los resultados obtenidos. Los comportamientos en los tres órganos muestran diferencias en su comportamiento.

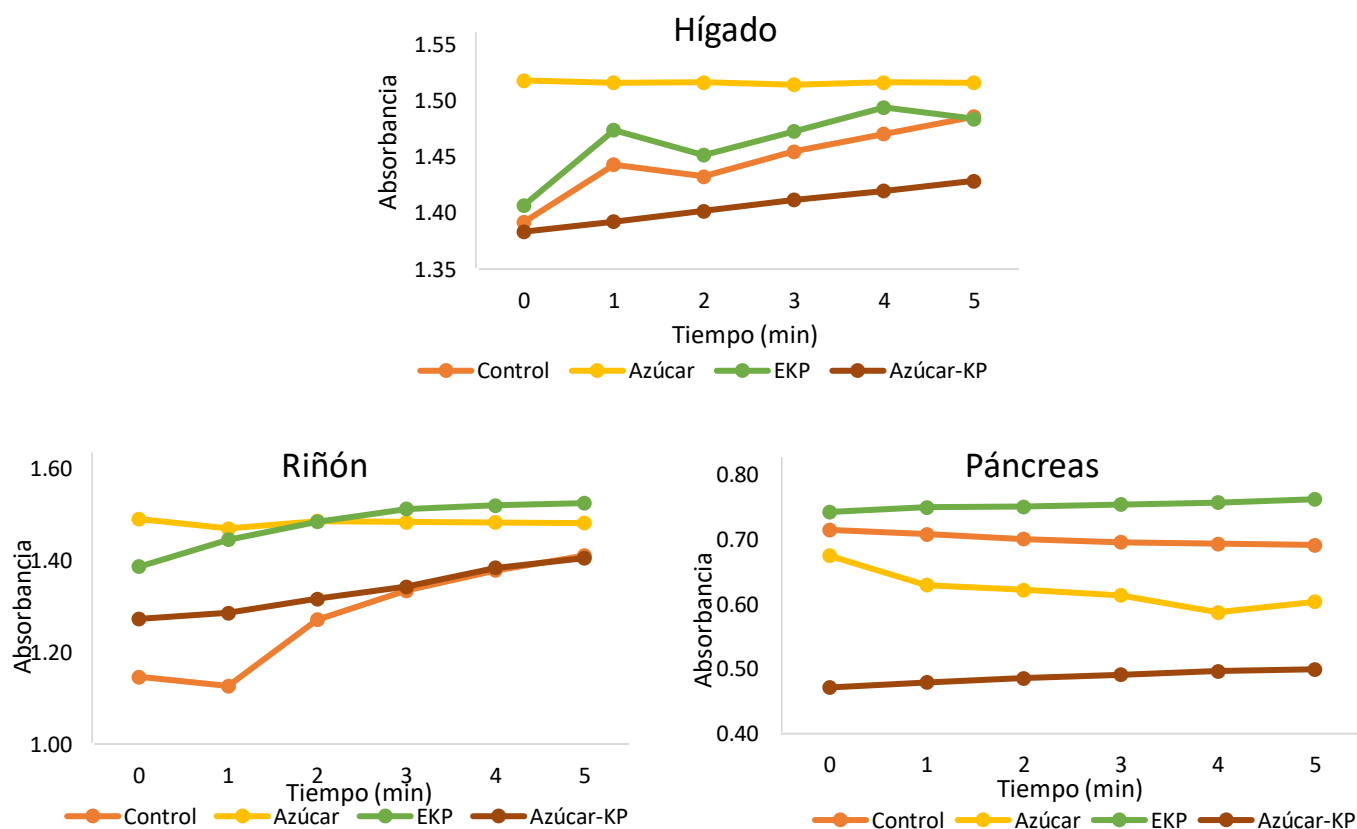


Figura 56. Actividad de Citocromo C-oxidasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra ($n=6$).

La actividad de la enzima en el hígado fue inhibida en presencia de la solución de azúcar. En condiciones control, la actividad aumento 0.1 unidades. Cuando los animales fueron tratados con el extracto de KP, la actividad tuvo un aumento significativo de 0.07 unidades. De la misma forma que con la exposición a azúcar, el grupo expuesto a ella y tratado con el extracto mostró inhibición de la actividad, denotando que el tratamiento con KP no pudo restaurar la actividad observada en el grupo control.

Tabla 23. Actividad de Citocromo C-oxidasa en hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar hembra (n=6). El promedio $\pm$ la desviación estándar (n=6), que no comparten una letra son significativamente diferentes ^Ap $\leq$ 0.05, B.

Hígado				
Tiempo (min)	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
0	1.39 $\pm$ 0.09 ^A	1.52 $\pm$ 0.04 ^A	1.41 $\pm$ 0.13 ^A	1.38 $\pm$ 0.11 ^A
1	1.44 $\pm$ 0.15	1.52 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.16	1.39 $\pm$ 0.11
2	1.43 $\pm$ 0.07	1.52 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.13	1.40 $\pm$ 0.11
3	1.45 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.05	1.47 $\pm$ 0.15	1.41 $\pm$ 0.10
4	1.47 $\pm$ 0.06	1.52 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.16	1.42 $\pm$ 0.10
5	1.49 $\pm$ 0.06 ^B	1.52 $\pm$ 0.04 ^A	1.48 $\pm$ 0.15 ^B	1.43 $\pm$ 0.10 ^A

Riñón				
Tiempo (min)	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
0	1.15 $\pm$ 0.19 ^A	1.49 $\pm$ 0.04 ^A	1.39 $\pm$ 0.09 ^A	1.27 $\pm$ 0.08 ^A
1	1.13 $\pm$ 0.29	1.47 $\pm$ 0.09	1.44 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.08
2	1.27 $\pm$ 0.19	1.48 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.08
3	1.33 $\pm$ 0.19	1.48 $\pm$ 0.04	1.51 $\pm$ 0.08	1.34 $\pm$ 0.08
4	1.38 $\pm$ 0.18	1.48 $\pm$ 0.04	1.52 $\pm$ 0.09	1.38 $\pm$ 0.06
5	1.41 $\pm$ 0.17 ^B	1.48 $\pm$ 0.04 ^A	1.52 $\pm$ 0.10 ^B	1.40 $\pm$ 0.06 ^B

Páncreas				
Tiempo (min)	Control	Azúcar	EKP	Azúcar-KP
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
0	0.71 $\pm$ 0.18 ^A	0.67 $\pm$ 0.06 ^A	0.74 $\pm$ 0.11 ^A	0.47 $\pm$ 0.06 ^A
1	0.71 $\pm$ 0.18	0.63 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.10	0.48 $\pm$ 0.06
2	0.70 $\pm$ 0.19	0.62 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.10	0.49 $\pm$ 0.06
3	0.70 $\pm$ 0.17	0.61 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.10	0.49 $\pm$ 0.06
4	0.69 $\pm$ 0.17	0.59 $\pm$ 0.09	0.76 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.06
5	0.69 $\pm$ 0.17 ^A	0.60 $\pm$ 0.07 ^A	0.76 $\pm$ 0.09 ^A	0.50 $\pm$ 0.06 ^A

La actividad de la enzima en el riñón, bajo condiciones normales, presento un incremento significativo de 0.26 unidades. La exposición a azúcar inhibió la actividad de la enzima mientras que, la administración de KP y el tratamiento con éste extracto en ratas expuestas a la solución de azúcar presentaron incremento en la actividad de la enzima en función del tiempo. Dichos incrementos fueron 0.13 y 0.27 unidades respectivamente. Esto indica que el tratamiento con el extracto pudo reestablecer la actividad de la enzima

en ratas expuestas a la solución de azúcar. En el páncreas no se observó actividad en ninguno de los grupos experimentales. Este comportamiento puede estar influido por la disponibilidad de sustratos, el estado fisiológico y patológico del páncreas. Por ejemplo, se ha observado que la inflamación y el estrés oxidativo pueden alterar la actividad de la enzima.

7.6 Comportamiento bioquímico en machos y hembras

En muchos casos, la investigación en ratas se lleva a cabo como un modelo animal para comprender mejor la biología y los mecanismos subyacentes en los humanos. Al incluir tanto machos como hembras, se pueden realizar observaciones más precisas y generalizables con respecto a los aspectos biológicos y de género que podrían ser relevantes para los humanos. Debido a las altas diferencias encontradas entre machos y hembras, las tablas 24 y 25 muestran los resultados obtenidos de EROS las actividades de las enzimas antioxidantes medidas en los diferentes órganos y grupos experimentales.

Especies reactivas de oxígeno.

En la tabla se puede notar que, en el hígado, de los ocho grupos, siete tuvieron el mismo comportamiento, es decir el grupo expuesto a la solución de azúcar y tratado con el extracto crudo de KP generó más especies reactivas de oxígeno que los grupos control, azúcar y EKP. En el páncreas de las hembras control se determinó una concentración de EROs mucho mayor que en los tres grupos restantes y esta fue disminuyendo en función de los esquemas de tratamiento. Todo esto indica un comportamiento que depende de muchos factores. Hay que tener en cuenta que los animales de experimentación, así como los demás seres vivos, presentan susceptibilidad individual ante los diferentes tipos de estrés que se generan en sus organismos y por ello muchas veces hasta en el mismo grupo experimental, existen variaciones individuales importantes.

Tabla 24. Especies reactivas de oxígeno en los órganos hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho y hembras bajo los esquemas de exposición y tratamiento (n=6).

	Machos			Hembras		
	Hígado	Riñón	Páncreas	Hígado	Riñón	Páncreas
Control f	0.62 ± 0.28	1.35 ± 0.32	6.53 ± 1.84	1.27 ± 0.46	3.71 ± 0.68	40.96 ± 4.40
Azúcar	1.66 ± 0.42	3.73 ± 0.81	8.87 ± 2.82	2.82 ± 0.46	8.29 ± 0.74	7.28 ± 2.45
EKP	2.10 ± 0.52	3.19 ± 0.94	4.86 ± 1.29	2.21 ± 0.29	6.34 ± 0.90	33.63 ± 4.95
Azúcar-KP	4.25 ± 0.52	9.01 ± 1.66	36.66 ± 0.30	3.42 ± 0.82	8.36 ± 0.83	23.43 ± 7.15

Actividades enzimáticas antioxidantes.**Tabla 25.** Actividad de enzimas antioxidantes en los órganos hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar macho y hembras bajo los esquemas de exposición y tratamiento (n=6).

Hígado	MACHOS			HEMBRAS		
	GST	CAT	SOD	GST	CAT	SOD
Control final	6.85 ± 3.41	2.27 ± 0.95	0.265 ± 0.98	11.09 ± 5.25	3.72 ± 1.48	0.31 ± 0.12
Azúcar	3.13 ± 1.59	2.08 ± 0.99	10.2 ± 4.45	9.9 ± 3.63	5.62 ± 1.78	0.33 ± 0.14
EKP	4.37 ± 2.09	5.77 ± 2.48	1.02 ± 0.56	0.53 ± 2.54	4.15 ± 1.77	0.81 ± 0.35
Azúcar-KP	0.62 ± 0.26	3.90 ± 1.47	3.06 ± 1.47	1.42 ± 0.572	3.06 ± 1.14	3.06 ± 1.44

Riñón	MACHOS			HEMBRAS		
	GST	CAT	SOD	GST	CAT	SOD
Control final	2.65 ± 0.77	3.26 ± 1.52	0.265 ± 0.98	11.09 ± 5.25	3.72 ± 1.48	0.31 ± 0.12
Azúcar	0.039 ± 0.018	3.34 ± 2.16	10.2 ± 4.45	9.9 ± 3.63	5.62 ± 1.78	0.33 ± 0.14
EKP	0.541 ± 0.18	3.71 ± 1.52	1.02 ± 0.56	0.53 ± 2.54	4.15 ± 1.77	0.81 ± 0.35
Azúcar-KP	0.86 ± 0.41	2.54 ± 1.26	3.06 ± 1.47	1.42 ± 0.572	3.06 ± 1.14	3.06 ± 1.44

Páncreas	MACHOS			HEMBRAS		
	GST	CAT	SOD	GST	CAT	SOD
Control final	8.57 ± 3.83	2.16 ± 3.4	0.27 ± 0.13	7.91 ± 3.39	2.42 ± 1.19	0.83 ± 0.41
Azúcar	4.07 ± 1.6	3.4 ± 1.77	10.12 ± 3.14	4.16 ± 2.36	3.93 ± 1.93	1.05 ± 0.51
EKP	10.3 ± 4.9	2.37 ± 1.13	0.92 ± 0.40	3.99 ± 1.88	3.36 ± 1.6	0.97 ± 0.40
Azúcar-KP	11.08 ± 1.67	2 ± 1	0.34 ± 0.131	12.8 ± 2.26	1.37 ± 0.67	0.08 ± 0.03

El hígado es el órgano encargado de los procesos de detoxificación y de un gran porcentaje de trabajo eliminarlos del organismo. En este trabajo los animales fueron expuestos a una solución al 20 % de sacarosa y tratados con un extracto crudo de hojas de *kalanchoe pinnata*. Tanto la sacarosa y sus componentes como todos los metabolitos existentes en el extracto representan una gran carga de xenobióticos para este órgano. Aunque el extracto pueda contener sustancias con propiedades diversas, entre ellas las antioxidantes, todas representan compuestos externos a los organismos. La forma en la que las células respondan dependerá tanto de los factores propios del individuo como los de las sustancias ingeridas. En este caso, la combinación de azúcar y KP ocasionó el aumento de la actividad de las tres enzimas. No obstante, al medir la actividad de catalasa en ratas hembras se pudo observar que el extracto de KP si protegió al hígado de los efectos del azúcar.

En el riñón los efectos también dependieron de los factores mencionados anteriormente. En este órgano la actividad de SOD determinada en machos fue la que pudo ser reestablecida en ratas expuestas a azúcar y tratadas con el extracto. En algunos grupos se observó el incremento en la actividad de SOD cuando los animales fueron expuestos a azúcar, evidenciando de esta manera la posible relación entre la generación de radicales superóxido y la presencia de un exceso de azúcar (sacarosa).

El páncreas fue el órgano en donde existió una menor actividad enzimática observable, pero también fue el órgano en el que más se observó protección del extracto de KP en las ratas expuestas a azúcar.

El análisis del comportamiento de las enzimas implica la comprensión de las características del medio ambiente que las rodea. El efecto de un agente externo puede ser debido a acciones directas, como la unión de los compuestos a los sitios activos de las enzimas, o por efectos indirectos como la generación de especies reactivas de oxígeno. En este trabajo se detectó que en muchos casos los xenobióticos administrados generaron aumento de especies reactivas de oxígeno que pudieron ser la causa de la activación o inhibición del funcionamiento enzimático.

Capítulo 8: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

1. En este trabajo, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) aplicando sistemas de solventes con diferente polaridad resultó ser el método más eficiente para extraer los metabolitos de las hojas de *Kalanchoe pinnata*.
2. La hojas de *Kalanchoe pinnata*, cultivadas en Tuxtepec, poseen flavonoides, taninos, terpenoides, esteroides y glicósidos.
3. Las hojas de *Kalanchoe pinnata* poseen propiedades antioxidantes entre las que se encuentran: poder reductor, capacidad para estabilizar radicales libres, un alto contenido fenólico, capacidad para descomponer peróxido de hidrógeno, así como para realizar el barrido de radicales superóxido evaluado.
4. La administración de una solución al 20 % de sacarosa produjo alteraciones en los niveles de glucosa en sangre, peso corporal y peso de los órganos, inflamación y alteraciones renales, hepáticas y del metabolismo de los carbohidratos.
5. El tratamiento con el extracto crudo de hojas de *Kalanchoe pinnata*, antagonizó, en la mayoría de los casos, los efectos fisiológicos y bioquímicos provocados por la solución azucarada. Este efecto dependió del sexo de los roedores.
6. Los resultados encontrados al estudiar los efectos físicos y bioquímicos de la solución azucarada y su posible tratamiento son datos que no se pudieron comparar con otros sistemas de estudio al carecer de bibliografía, por lo que se requerirá demás estudios para su completo entendimiento.

Perspectivas

1. Realizar nuevos extractos de las hojas de *Kalanchoe pinnata* empleando disolventes polares y no polares, con la finalidad de extraer la mayor cantidad de metabolitos presentes.
2. Analizar el contenido de metabolitos en otras partes de la planta o, en su caso, otras especies de *Kalanchoe*, para comparar su composición fitoquímica y sus propiedades antioxidantes.
3. Realizar la elucidación estructural de algunos de los compuestos aislados.
4. Realizar pruebas fisiológicas y bioquímicas de los metabolitos extraídos individualmente, en ratas Wistar macho y hembras.
5. Evaluar las posibles propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas de nuevos extractos o de los metabolitos extraídos a partir de las plantas del género *Kalanchoe*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Sánchez, P. E. R., & López, V. G. C. 2020. Las bebidas azucaradas y su efecto en la salud infantil. UNIVERSITARIOS POTOSINOS, 254, 12-15. <https://bit.ly/47hu0h5>
- 2 Carvallo, P., Carvallo, E., Barbosa Da Silva, S., Mandarin De Lacerda, C., Hernández, A., Del Sol, M. 2015. Efectos Metabólicos del Consumo Excesivo de Fructosa Añadida. International Journal of Morphology, 37(3), pp. 1058-1066
- 3 Gómez, L., E. Jacoby, L. Ibarra, D. Lucumí, A. Hernández, D. Parra, P. Hallal. 2011. Patrocinio de programas de actividad física por parte de la industria de bebidas azucaradas: ¿salud pública o relaciones públicas?, Revista de Saúde Pública, 45(2): 423-427.
- 4 Chandran, U., S.E. McCann, G. Zirpoli, Z. Gong, Y. Lin, C.C. Hong, E.V. Bandera, 2014. El consumo de energía de alta densidad Los alimentos, comidas rápidas, BA y el riesgo de cáncer de mama en afroamericanos y americanos europeos Mujeres. Nutrición y Cáncer, 66 (7): 1187- 1199
- 5 Kregiel, D. 2015. Health Safety of Soft Drinks: Contents, Containers, and Microorganisms. BioMed Research International, 2015, 128697. doi:10.1155/2015/128697
- 6 Gutiérrez Ruvalcaba, C. L., Vásquez-Garibay, E., Romero-Velarde, E., Troyo-Sanromán, R., Cabrera-Pivaral, C., Ramírez Magaña, O. 2009. Consumo de refrescos y riesgo de obesidad en adolescentes de Guadalajara, México. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 66(6), 522-528.
- 7 Welsh J. A., Sharma A. J., Grellinger L., Vos M. B. Consumption of added sugars is decreasing in the United States. Am J Clin Nutr. 2011; 94: 726-734.
- 8 Kovalskys, I., Rigotti A., Koletzko, B., Fisberg, M., Gómez, G., Herrera-Cuenca, M., et al. Latin American consumption of major food groups: Results from the ELANS study. PLoS One. 2019; 14: e0225101.
- 9 Paredes-Serrano, P., Alemán Castillo, S. J., Castillo Ruiz, O., Perales Torres, A. 2016. Consumo de bebidas azucaradas y su relación con enfermedades crónicas no transmisibles en niños. Biotecnia, 18(2), pp. 55-61
- 10 Social, c. 2018. Estadísticas a propósito del día mundial contra la obesidad (12 de noviembre). Inegi, 528/20. Consultado el 18 de agosto del 2021 en la página web: <https://bit.ly/3z2kVYv>
- 11 Morales Salazar, S. F. 2015. *Temas Selectos de Bioquímica General*. Dagus Unison. Consultado el 29 de marzo del 2020 en la página web: <https://bit.ly/3rZuXIk>
- 12 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1992. Biología Molecular de la Célula. 2da ed. Ed. Omega SA Barcelona, España. pp 42-89
- 13 Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Martins, G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 26(2), 76-86.
- 14 Li, S. R., Oelbaum, R. S., Baroni, M. G., Stock, J., Galton, D. J. 1988. Association of genetic variant of the glucose transporter with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Lancet, 332(8607), 368-370.

- 15 Castrejón, V., Carbó, R., Martínez, M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(2), 49-57.
- 16 Matthaei, S., Stumvoll, M., Kellerer, M., Häring, H. U. 2000. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine reviews*, 21(6):585-618.
- 17 Cardella, Hernández. 1999. *Bioquímica Medica: Metabolismo Intermediario y su Regulación* (Segunda ed., Vol. 3, Cap. 44). <https://bit.ly/3GtNxg9>
- 18 Rigalli, A. 2016. Enzimas de glucólisis y gluconeogénesis. Un enfoque detallado.
- 19 Lehinger LA: *Bioquímica*. 2a Edición. Barcelona. Omega, 1982: 427-452
- 20 Menéndez Valderrey, Juan Luis. "La Glucólisis". *asturnatura.com* [en línea] Num. 839, 26/04/2021 Consultado el 07 de febrero del 2022 en la página web: <https://bit.ly/3JfgTkr> ISSN 1887-5068
- 21 MURRAY, R. K., BENDER, D. A., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J., RODWELL, V. W., WEIL, P. A. 2010. *Harper Bioquímica Ilustrada: Vol. 28a edición*. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- 22 Riveros, M. J., Parada, A., Pettinelli, P. 2014. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud: malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutrición Hospitalaria*, 29(3):491-499.
- 23 Lay, R. (2003). Insulinoterapia. *Revista Médica Herediana*, 14(3), 140-144.
- 24 Loza-Medrano, S. S., Baiza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M. Á., Cruz-López, M., Díaz-Flores, M. 2019. Molecular alterations induced by fructose and its impact on metabolic diseases. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(5):491-504.
- 25 Bray G. A. (2013). Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(2), 220–225. <https://doi.org/10.3945/an.112.002816>
- 26 Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Hatcher, B., Cox, C. L., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J. P., Seibert, A., Krauss, R. M., Chiu, S., Schaefer, E. J., Ai, M., Otokoza, S., Nakajima, K., Nakano, T., Beyen, C., Havel, P. J. 2009. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), 1322–1334. <https://doi.org/10.1172/JCI37385>
- 27 Humberto, M., Altamirano, T. 2015. METABOLISMO DE LIPIDOS. [Consultado el 01 de mayo del 2022 en la página web: <https://bit.ly/3s4bdTX>
- 28 Carvallo, Pamela, Carvallo, Eugenia, Barbosa-da-Silva, Sandra, Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto, Hernández, Alfonso, del-Sol, Mariano. (2019). Efectos Metabólicos del Consumo Excesivo de Fructosa Añadida. *International Journal of Morphology*, 37(3):1058-1066. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022019000301058>
- 29 Sun, S. Z., Empie, M. W. 2012. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutrition metabolism*, 9(1), 89. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-89>

-
- 30 Hu F. B. 2013. Resolved: there is sufficient scientific evidence that decreasing sugar-sweetened beverage consumption will reduce the prevalence of obesity and obesity-related diseases. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 14(8):606–619. <https://doi.org/10.1111/obr.12040>
- 31 Bray, G. A., Popkin, B. M. 2014. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?:health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes care*, 37(4), 950–956. <https://doi.org/10.2337/dc13-2085>
- 32 Rosset, R., Surowska, A., Tappy, L. 2016. Pathogenesis of Cardiovascular and Metabolic Diseases: Are Fructose-Containing Sugars More Involved Than Other Dietary Calories?. *Current hypertension reports*, 18(6), 44. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0652-7>
- 33 Abdelmalek, M. F., Lazo, M., Horska, A., Bonekamp, S., Lipkin, E. W., Balasubramanyam, A., Bantle J.P., Johnson R.J., Diehl A.M. Fatty Liver Subgroup of the Look AHEAD Research Group. 2012. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology*, 56(3):952-960.
- 34 Havel P. J. 2005. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/ carbohydrate metabolism. *Nutrition reviews*, 63(5), 133–157. <https://doi.org/10.1301/nr.2005.may.133-157>
- 35 Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Kang, D., Tolan D., Sanchez-Lozada, L., Rosen, H., Lanaspá, M. Johnson, R. J. 2018. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(5):1063-1075.
- 36 Alcántara-Ortiz, M. G., Campos-Serrano, J., Ibarra-Sánchez, A. 2021. Desregulación metabólica y consecuencias clínicas por el consumo de fructosa. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 24.
- 37 Silva, P., Durán, S. 2014. BA, más que un simple refresco. *Revista chilena de nutrición*, 41(1):90-97.
- 38 Vos, M. B., Kimmons, J. E., Gillespie, C., Welsh, J., Blanck, H. M. (2008). Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape journal of medicine*, 10(7):160
- 39 Bray, G. A., Nielsen, S. J., Popkin, B. M. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 79(4):537–543. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>
- 40 Gómez-Salas, G., Quesada-Quesada, D., Chinnock, A., Nogueira-Previdelli, A., ELANS, G. 2019. Consumo de azúcar añadido en la población urbana costarricense: estudio latinoamericano de nutrición y salud ELANS-Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 61(3):111-118.
- 41 Cabello, J. F., Giugliani, R. 2015. Errores innatos del metabolismo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(4):483-486.
- 42 Tappy, L., Lê, K. A. 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological reviews*.

-
- 43 López, M. L. P., Villavicencio, A. Z., Aguirre, B. A. R., Gómez, M. A. C. 2020. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud. *Medicina e Investigación Universidad Autónoma del Estado de México*, 8(2):38-44.
- 44 Lizarzaburu Robles, J. C. 2013. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 74, No. 4, pp. 315-320). UNMSM. Facultad de Medicina.
- 45 Rojas, J., Bermúdez, V., Leal, E., Cano, R., Luti, Y., Acosta, L., Sánchez, D. 2008. Insulinorresistencia e hiperinsulinemia como factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 27(1):29-39.
- 46 Koyama, K., Chen, G., Lee, Y., Unger, R. H. 1997. Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 273(4), E708-E713.
- 47 Riverón Corteguera, R. L. 2002. Enfermedades emergentes y reemergentes: un reto al siglo XXI. *Revista Cubana de Pediatría*, 74(1):7-22.
- 48 Bouza, M. D. J. S., Castellanos, M., Frenes, P. S. 2007. Enfermedades metabólicas. Material de apoyo para Bioquímica. *MediSur*, 5(2):199-225.
- 49 Tamayo, M. H., Soca, P. E. M., Hidalgo, M. M. M., López, L. M. P., Pérez, I. P., Estévez, M. R. 2017. Behaviour of clinical, anthropometric and laboratory variables in patients with metabolic syndrome. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*, 7(1):102-109.
- 50 Irecta Najera, C. A., Álvarez Gordillo, G. D. C. 2016. Mecanismos moleculares de la obesidad y el rol de las adipocinas en las enfermedades metabólicas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2):174-183.
- 51 Bastarrachea, R. A., López-Alvarenga, J. C., Bolado-García, V. E., Téllez-Mendoza, J., Laviada-Molina, H., Comuzzie, A. G. 2007. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gaceta médica de México*, 143(6):505-512.
- 52 Martín-Aragón, S. 2006. Azúcares y edulcorantes en la dieta: características y usos. *Farmacia profesional*, 20(2):66-70.
- 53 Abdelmalek, M. F., Lazo, M., Horska, A., Bonekamp, S., Lipkin, E. W., Balasubramanyam, A., Bantle J.P., Johnson R.J., Diehl A.M. Fatty Liver Subgroup of the Look AHEAD Research Group. 2012. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology*, 56(3):952-960.
- 54 Espinosa-Lira, F. American Diabetes Association. 2020. Resumen de casificación y diagnóstico de la diabetes. *Sipnasis mx*. Consultado el 19 de agosto del 2021 en la página web: <https://bit.ly/2W9XVIQ>
- 55 Gracia-Ramos, A., Cruz-Domínguez, M., Madrigal-Santillán, E., Morales-González, J., Vera-Lastra, O. 2015. Manejo de la hiperglucemia en pacientes hospitalizados. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2):192-199.

-
- 56 Manzanares, W., Aramendi, I. 2010. Hiperglucemia de estrés y su control con insulina en el paciente crítico: evidencia actual. *Medicina intensiva*, 34(4):273-281.
- 57 Gracia-Ramos, A. E., del Pilar Cruz-Dominguez, M., Madrigal-Santillan, E. O., Morales-González, J. A., Vera-Lastra, O. L. 2015. Manejo de la hiperglucemia en pacientes hospitalizados. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2):192-199.
- 58 Cortizo, A. M. 2021. Enfermedades metabólicas hereditarias. Libros de Cátedra.
- 59 Dungan, K. M., Braithwaite, S. S., Preiser, J. C. 2009. Stress hyperglycaemia. *Lancet* (London, England), 373(9677), 1798–1807. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60553-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60553-5)
- 60 McDonnell, M. E., Umpierrez, G. E. 2012. Insulin therapy for the management of hyperglycemia in hospitalized patients. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 41(1):175-201.
- 61 American Diabetes Association. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 33(Supplement 1):S62-S69
- 62 Mayo, C. 2020. Hiperglicemia en la diabetes - Síntomas y causas - Mayo Clinic. Mayo Clinic. Consultado el 7 de junio en la página web: <https://mayoclinic.org/3mz6aZW>
- 63 Khovidhunkit, W., Kim, M. S., Memon, R. A., Shigenaga, J. K., Moser, A. H., Feingold, K. R., Grunfeld, C. 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of lipid research*, 45(7):1169–1196. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300019-JLR200>
- 64 Miranda-Garduño, L. M., Reza-Albarrán, A. 2008. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gaceta médica de México*, 144(1):36-46.
- 65 Sánchez, P. T., Sirera, R., Peiró, G., Palmero, F. 2008. Estrés, depresión, inflamación y dolor. *REME*, 11(28):1-15.
- 66 Miranda-Garduño, L. M., Reza-Albarrán, A. 2008. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gaceta médica de México*, 144(1):36-46.
- 67 Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., Spiegelman, B. M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (New York, N.Y.), 259(5091), 87–91. <https://doi.org/10.1126/science.7678183>
- 68 Hernández, A. G., Perdomo, L., Escribano, Ó., Benito, M. 2014. Papel del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 80, No. 2).
- 69 Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., Hotamisligil, G. S. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* (New York, N.Y.), 306(5695):457–461. <https://doi.org/10.1126/science.1103160>
- 70 Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., Matsuoka, T. A., Ozawa, K., Ogawa, S., Hori, M., Yamasaki, Y., Matsuhisa, M. 2005. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *The Journal of biological chemistry*, 280(1):847–851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411860200>

-
- 71 Lin Y, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, et al. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005;280:4617-4626
- 72 Lowell, B. B., Shulman, G. I. 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5708):384–387. <https://doi.org/10.1126/science.110434>
- 73 Bartosz, G. 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. *Biochemical pharmacology*, 77(8):1303-1315.
- 74 Pitocco, D., Tesauro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G. and Cardillo, C. 2013. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci*, 14, 21525-21550
- 75 Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., et al. 2015. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*, 16, 193-217.
- 76 Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z. G., Ghanbari, H. A. 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences*, 14(12):24438-24475.
- 77 Rizwan, S., ReddySekhar, P., MalikAsrar, B. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants redox signaling*.
- 78 Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M. C., Andriantsitohaina, R. 2014. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- 79 Hernández Espinosa, D. R., Barrera Morín, V., Briz Tena, O., González Herrera, E. A., Laguna Maldonado, K. D., Jardínez Díaz, A. S., Matuz Mares, D. 2019. El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 62(3), 6-19.
- 80 Carvajal Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1):91-100.
- 81 Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M. Á., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel, A. M., Kumate-Rodríguez, J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta médica de México*, 140(4):437-448.
- 82 Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865):813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- 83 De Diagnóstico, G., Manejo, Y. PARTE II: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD Oficina Regional de la Hiperglucemia Diabetes mellitus 18. Consultado el 3 de mayo del 2022 en la página web: <https://bit.ly/34D1M5b>
- 84 Amaya-Chávez, A., Dolores-Ledezma, E., Álvarez-Sánchez, P., Ferreira-Rubio, G., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M. 2007. Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicémica de la glibenclamida. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(3):5-11.
- 85 American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. 2019. *Diabetes Care* 2019;42(Suppl. 1):S13–S28
- 86 Figueroa, M. C., Pérez, I. H., Mejía, R. 2013. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Revista MVZ Córdoba*, 18(supl):3699-3707.

-
- 87 International Diabetes Federation. 2019. Guía De Incidencia Política De La Novena Edición Del Atlas De La Diabetes De La Fid 2019. Atlas De La Diabetes De La Fid, 9°, 6–20. Consultado el 18 de agosto del 2021 en la página web: <https://bit.ly/2W7a5lm>
- 88 INEGI. (2019). Características De Las Defunciones Registradas En México 2019. Consultado el 18 de agosto del 2021 en la página web: <https://bit.ly/3CWwVNE>
- 89 Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., Suarez, D. 2018. Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. Fundación Universitaria Agraria de Colombia-UNIAGRARIA, Colombia.
- 90 Pereyra-Elías, R., Fuentes Delgado, D. 2012. Medicina Tradicional versus Medicina Científica ¿En verdad somos tan diferentes en lo esencial? *Acta Médica Peruana*, 29(2):62-63.
- 91 Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, 17(3):215–234. <https://doi.org/10.1039/a902202c>
- 92 Cañigüeral S., Vila R. Fitoterapia: concepto y límites. Fuentes de información. En: Fitoterapia: Vademécum de prescripción [dir. Artech A.], 3ra Ed., Barcelona, 23-30, 1998.
- 93 Goetz P. Phytotherapie in Frankreich. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 20, 320-328, 1999.
- 94 Buckingham, J. (1994). *Dictionary of natural products*. London: Chapman Hall.
- 95 Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J. A., Molina-Torres, J. 2004. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1):19-36.
- 96 Braz-Filho R. Química de Produtos Naturais: Importance, Interdisciplinary, Difficulties and Perspectives. The pilgrimage of a pacatubano. *Química Nova*, 17, 405-445, 1994
- 97 Farnsworth N.R. Screening for new medicines. En: Biodiversity, Wilson, E.D. ed., National Academy Press, 83-97, 1988.
- 98 Phillipson J. D. 1995. A matter of some sensitivity. *Phytochemistry*, 38(6):1319–1343. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00780-w](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00780-w)
- 99 Tyler V.E., Brandy L.R., Robbers J.E. 1988. Pharmacognosy, Ninth Edition, Lea Febiger, Philadelphia.
- 100 Sharma, A., Shanker, C., Tyagi, L. K., Singh, M., Rao, C. V. 2008. Herbal medicine for market potential in India: an overview. *Acad J Plant Sci*, 1(2), 26-36.
- 101 Herrera, I., Nassar, J. M. 2009. Reproductive and recruitment traits as indicators of the invasive potential of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) and *Stapelia gigantea* (Apocynaceae) in a Neotropical arid zone. *Journal of Arid Environments*, 73(11):978-986.
- 102 Herrera, I., Hernandez, M. J., Lampo, M., Nassar, J. M. 2012. Plantlet recruitment is the key demographic transition in invasion by *Kalanchoe daigremontiana*. *Population Ecology*, 54(1):225-237.

-
- 103 Tkalec, M., Car, D., Gospočić, J., Križaić, I., Duž, K., Vidaković-Cifrek, Ž. E. L. J. K. A. 2012. Response of *Kalanchoe daigremontiana* to wounding and infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Periodicum biologorum*, 114(1):83-90.
- 104 Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., Hayashi, H., Murakami, A., Sakai, H., Ohigashi, H. 2001. Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* × *butiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(4):947-949.
- 105 Kruk J, Pisarski A, Szymańska R. Novel vitamin E forms in leaves of *Kalanchoe daigremontiana* and *Phaseolus coccineus*. *J Plant Physiology*. 2011;68(17):2021-7.
- 106 Van Maarseveen C, Jetter R. Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. *Phytochemistry*. 2009;70(7):899-906.
- 107 Wagner, H., Proksch, A. 1985. Immunostimulatory drugs of fungi and higher plants. *Economic and medicinal plant research/edited by H. Wagner, Hiroshi Hikino, Norman R. Farnsworth*.
- 108 Mosquera, F. 2021. Hierba de bruja *Kalanchoe pinnata*. [Consultado el 03 de mayo del 2021 en la página web: <https://bit.ly/3BvjKSv>]
- 109 Pushug, C., del Rocío, M. 2017. Determinación de la actividad antiinflamatoria de *Kalanchoe pinnata* mediante inhibición de edema plantar inducido por carragenina en ratas (*Rattus norvegicus*) (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- 110 Pattewar, S. V. 2012. *Kalanchoe pinnata*: phytochemical and pharmacological profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4):993.
- 111 Rodríguez H. G. R., Méndez, J. D. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciencia Veterinaria*, México, 6:347-377.
- 112 Kanaly Olivares, V. N., Ramírez Vilches, V. A. 2015. Determinación de potencial obesogénico de dieta de cafetería personalizada por preferencia individual vs. dieta de cafetería estándar en un modelo de susceptibilidad individual a obesidad (Doctoral dissertation, Universidad Andrés Bello (Chile)).
- 113 Rodríguez, D. B. M., Cervantes, V. G. A., Housni, F. E., López-Espinoza, A., Moreno, A. G. M., Flores-Ventura, K. A. 2016. Estudio de la actividad física y el consumo de dieta de cafetería en modelos animales. *avances y perspectivas*, 177.
- 114 Dupas, J., Feray, A., Goanvec, C., Guernec, A., Samson, N., Bougaran, P., Guerrero F., Mansourati, J. 2017. Metabolic syndrome and hypertension resulting from fructose enriched diet in Wistar rats. *BioMed research international*, 2017.
- 115 McGarry J. D. 1992. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5083), 766–770. <https://doi.org/10.1126/science.1439783>
- 116 Garcia, J. C., Arias, J., Garcia, C., Vara, E., Balibrea, J. L. 2002. Modificación de los mediadores inflamatorios en isquemia-reperfusión intestinal en un modelo de diabetes tipo 2. *Cirugía Española*, 71(6):276-286.

-
- 117 Jaiswal, D., Rai, P. K., Kumar, A., Mehta, S., Watal, G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 123(3):392-396.
- 118 Gil, A. G., Madariaga, Y. G., Leyva, G. M., Ugalde, F. H., González, A. S. 2012. Daño oxidativo en un modelo experimental de hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas wistar. *Revista Médica Electrónica*, 34(4):406-146.
- 119 González Gil, A., González Madariaga, Y., Heredia Ruiz, D., Fernández Caraballo, D., Ballesteros Hernández, M. 2013. Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas Wistar. *Revista Médica Electrónica*, 35(2):95-104.
- 120 Esteves Mar, A. I. 2016. Efecto del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratas Wistar con diabetes inducida.
- 121 Quintero Naranjo, C. M. 2019. Evaluación del peso corporal, tejido adiposo y preferencias alimentarias en ratas wistar expuestas a bebidas con endulzantes calóricos durante la gestación y la lactancia.
- 122 Chimal-Muñoz, M., Hernández-Lagunes, A., López-Muñoz, JDJD y Moreno-Cortés, ML 2019. Cambios histológicos en la rata Wistar hiperglucémica tratada con insulina a dosis no normoglucemiantes. *Acta Médica del Centro*, 13 (2):185-196.
- 123 Leticia, B. M., Tahiry, G. H., Jose Luis, M. M., Cindy, F. G., Alain, Á. M., Maryoil, Q. A., Sonia, C. H. 2020. Efecto de la hiperglucemia pregestacional en la morfología fetal en un modelo de diabetes experimental. In I Congreso Virtual de Ciencias Básicas Biomédicas de Granma.
- 124 Toshihiro, K. WCMC, T. Toshitake, and M. Taro. Sterols of *Kalanchoe pinnata*. First report of the isolation of both C- 24 epimers of 24-Alkyl-A25-sterol from higher plants. *Lipids*. 1991,26: 660
- 125 Yamagishi, T., Haruna, M., Yan, X. Z., Chang, J. J., Lee, K. H. 1989. Antitumor agents, 110, Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. *Journal of Natural Products*, 52(5):1071-1079.
- 126 Salahdeen, H. M., Yemitan, O. K. 2006. Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. *African journal of biomedical research*, 9(2).
- 127 Aransiola, E. F., Daramola, M. O., Iwalewa, E. O., Seluwa, A. M., Olufowobi, O. O. 2014. Anti-diabetic effect of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 8(1):89-93.
- 128 Kamal, Y., Ch, A., Uzair, M., Irshad, N., Yaseen, M., Hussain, I. 2014. IN VITRO EVALUATION OF ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL AND PHYTOTOXICITY ACTIVITY OF DIFFERENT EXTRACTS OF LEAVES OF *KALANCHOE PINNATA*. *Journal of Applied Pharmacy*, 446, 446–450. Revisado en: <https://www.longdom.org/open-access/in-vitro-evaluation-of-antibacterial-antifungal-and-phytotoxicity-activity-of-different-extracts-of-leaves-of-kalanchoe-pinnata-.pdf>
- 129 Menon, N., Sparks, J., Omoruyi, F. O. 2016. Oxidative Stress Parameters and Erythrocyte Membrane Adenosine Triphosphatase Activities in Streptozotocin-induced Diabetic Rats Administered Aqueous Preparation of *Kalanchoe Pinnata* Leaves. *Pharmacognosy research*, 8(2):85–88. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.172656>

-
- 130 Ramon, P., Sparks, J., Omoruyi, F. 2020. Effect of Combined K. pinnata and Metformin Preparation on Inflammatory Cytokines in Normal and Diabetic Skeletal Muscle Cells. *Journal of Medicinal Food*.
- 131 Coutinho, M. A. S., Casanova, L. M., Nascimento, L. B. D. S., Leal, D., Palmero, C., Toma, H. K., Dos-Santos, E. P., Nasciutti, L. E. Costa, S. S. 2020. Wound healing cream formulated with Kalanchoe pinnata major flavonoid is as effective as the aqueous leaf extract cream in a rat model of excisional wound. *Natural Product Research*, 1-6.
- 132 Agüero-Hernández, A. L., Rosales-López, C., Herrera, C., Vargas-Picado, A., Muñoz, R., Abdelnour-Esquivel, A. 2020. Hypoglycemic Effect of Kalanchoe pinnata (Lam) Pers. Leaf Extract. *Pharmacognosy Journal*, 12(3).
- 133 Sudirman, M. S. 2020. The test anti-inflammatory activity of infusing Bryophyllum pinnatum (Kalanchoe pinnata) leaves (Kalanchoe pinnata) on edema in mice leg thigh male swiss webster. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1524, No. 1, p. 012073). IOP Publishing.
- 134 Hoyos, M. B., Serrano, L. F. G. 2019. Hacia la innovación en los productos naturales: sistemas terapéuticos transdérmicos con extractos de la planta Amazónica Pirarucú. *Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud*, 4, 61-74.
- 135 Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S. K., Watal, G. 2014. Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(5):539-542.
- 136 Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44:307–315.
- 137 Ohinishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Shizuo, T., Yoshiaki, S., Kimura, M., Kido, R., 1994. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry* 36:579–583
- 138 Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr., 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144–158
- 139 Ruch, R. J., Cheng, S. J., Klaunig, J. E. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.
- 140 Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1):276-287
- 141 Lozano-Triana, C. J. 2016. Examen general de orina: una prueba útil en niños. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(1):137-147.
- 142 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193:265-275.
- 143 Matés, J.M.; Pérez-Gómez, C.; Núñez de Castro, I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32: 595-603
- 144 Melo Ruiz, V., Cuamatzi Tapia, O. 2004. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Editorial Reverte S.A. U. Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco México.

-
- 145 Ko Kam-Ming, Hoy Yan-Leung 2007. Fortalecimiento de la capacidad de generación de ATP, actividad antioxidante y actividades inmunomoduladoras de Yin y Yang tonifying hierbas. *Chinese Medicine* 2: 3
- 146 Yáñez Ávila Ricardo. Manual de Prácticas de Bioquímica. 1a edición. Instituto Politécnico Nacional, modificado por Navarro Moreno Leticia Guadalupe, Universidad del Papaloapan.
- 147 Galleguillos, M., Plaza de los Reyes, R., Kessi, E., González, E., Letelier, M. E., Valdivia, G., Adarmes, H. 2012. Actividad glutatión S-transferasa en la membrana sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(2):179-183.
- 148 Chemat, F., Khan, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011
- 149 Wu, J., Lin, L., Chau, F., Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2001
- 150 Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*.
- 151 Salazar, J., Chávez, J. A., Turó, A., García-Hernández, M. J. Effect of ultrasound on food processing. en "novel food processing: Effects on rheological and functional properties". CRC Press, Estados Unidos de América. 2010, pp 65-84.
- 152 Suslick, K. S. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*. 1989, 2:80-86.
- 153 Deans, B. J., Bissember, A. C., Smith, J. A. 2016. Practical isolation of Asperuloside from *Coprosma quadrifida* via rapid pressurised hot water extraction. *Australian Journal of Chemistry*, 69(11):1219-1222.
- 154 SEMANART [Jerónimo Reyes Santiago]. 2018. Manual práctico de conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas mexicanas. Comisión Nacional Forestal, 1(1). <https://bit.ly/40JYO6f>
- 155 Quazi Majaz, A., Tatiya, A. U., Khurshid, M., Nazim, S., Siraj, S. 2011. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): a phytochemical and pharmacological review. *Int J Res Ayurveda Pharm*, 2(5), 1478-82.
- 156 DE Okwu and C Josiah. Evalution of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. February 2006; 5: 357-361.
- 157 C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V Plata-Oviedo, and R. M. Peralta, "Phenolic compounds in fruits - an overview," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, no. 10, pp. 2023–2044, 2012.
- 158 N. Auberval, S. Dal, W. Bietiger, E. Seyfritz, J. Peluso, C. Muller, M. Zhao, E. Marchioni, M. Pinget, N. Jeandidier, E. Maillard, V. Schini-Kerth, and S. Sigrist, "Oxidative Stress Type Influences the Properties of Antioxidants Containing Polyphenols in RINm5F Beta Cells.," *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2015, pp. 1–11, 2015.
- 159 D. Pradal, P. Vauchel, S. Decossin, P. Dhulster, and K. Dimitrov, "Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 32, pp. 137–146, 2016.

- 160 M. E. García-Pérez, M. Royer, A. Duque-fernandez, P. N. Diouf, T. Stevanovic, and R. Pouliot. 2010. "Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes," *J. Ethnopharmacol.*
- 161 S. Rajamanikandan, T. Sindhu, D. Durgapriya, D. Sophia, P. Ragavendran, and V. K. Gopalakrishnan. 2011. "Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Mollugo nudicaulis* by Invitro Assays," *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 310–316
- 162 H. Willeman, P. Hance, A. Fertin, N. Voedts, N. Duhal, J. F. Goossens, and J. L. Hilbert. 2014. "A method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory root foodstuffs," *Sci. World J.*, vol. 2014, pp. 1–11
- 163 Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., ... Ralser, M. 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3):927-963.
- 164 Cascales M. 1997. Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Fundacion Jose Casares Gil. España.
- 165 Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M. Á., Ponce-Pardo, J., Zarzosa-Norabuena, E. 2015. Evaluación de la técnica 2, 2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 15(1):57-60.
- 166 Knight, J., Madduma-Liyanage, K., Mobley, J. A., Assimios, D. G., Holmes, R. P. 2016. Ascorbic acid intake and oxalate synthesis. *Urolithiasis*, 44:289-297.
- 167 Nimse, S. B., Pal, D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35):27986-28006.
- 168 Tai, A., Iomori, A., Ito, H. 2017. Structural evidence for the DPPH radical-scavenging mechanism of 2-O- α -d-glucopyranosyl-l-ascorbic acid. *Bioorganic medicinal chemistry*, 25(20), 5303-5310.
- 169 Serra, H. M., Cafaro, T. A. 2007. Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(4):525-532.
- 170 Ramamoorthy, P. K., Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of engineering science and technology*, 2(1):70-80.
- 171 Li, H. Y., Hao, Z. B., Wang, X. L., Huang, L., Li, J. P. 2009. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource technology*, 100(2):-970-974.
- 172 Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4):375-383.
- 173 Claiborne, A. L. 2018. Catalase activity. In *CRC handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 283-284). CRC press.
- 174 Bonnichsen, R. K., Chance, B., Theorell, H. 1947. Catalase activity. *Acta chem. scand*, 1, 685-709.
- 175 ROSSI, M., Costa, M. F. (2012). Mecanismo antioxidante em plantas. 10ª mostra acadêmica UNIMEP. 10ª.

-
- 176 García Bacallao, L., Vicente García Gómez, L., Rojo Domínguez, D. M., Sánchez García, E. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 20(3):231-235.
- 177 CARDONA-AYALA, C. A. R. L. O. S., JARMA-OROZCO, A. L. F. R. E. D. O., ARAMÉNDIZ-TATIS, H. E. R. M. E. S. 2013. Mecanismos de adaptación a sequía en caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2):277-288.
- 178 Peralta-Pérez, M. D. R., Volke-Sepúlveda, T. L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1):75-88.
- 179 Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology and medicine*, 33(3):337-349.
- 180 Behndig, A., Svensson, B., Marklund, S. L., Karlsson, K. 1998. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Investigative ophthalmology visual science*, 39(3):471-475.
- 181 Mao, G. D., Thomas, P. D., Lopaschuk, G. D., Poznansky, M. J. 1993. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1):416-420.
- 182 Le Bourvellec, C., Hauchard, D., Darchen, A., Burgot, J. L., Abasq, M. L. 2008. Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*, 75(4):1098-1103.
- 183 Kalola, J., Shah, M. 2006. Actividad de barrido de los radicales libres de *Inula cappa*. *Ars Pharmaceutica* (Internet), 47(4):385-401.
- 184 Kyrkby, E., Römheld, V. 2007. Micronutrientes en la fisiología de las plantas: funciones, absorción y movilidad. Ecuador: Quito.
- 185 Galván, M. F. L. 2016. Aislamiento de Genes Antioxidantes a Partir de Plantas Endémicas de México.
- 186 Basciano, H., Federico, L., Adeli, K. 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition metabolism*, 2(1):1-14.
- 187 Quirós Cognuck, S., Reis, W. L., Silva, M., Debarba, L. K., Mecawi, A. S., de Paula, F. J. Antunes-Rodrigues, J. 2020. Sex differences in body composition, metabolism-related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiological Reports*, 8(20):e14597.
- 188 Van Hest, A., Van Haaren, F., Van de Poll, N. E. 1988. The behavior of male and female Wistar rats pressing a lever for food is not affected by sex differences in food motivation. *Behavioural brain research*, 27(3):215-221.
- 189 Schmitt, G. C., Arbo, M. D., Lorensi, A. L., Jacques, A. L. B., Nascimento, S. N. D., Mariotti, K. D. C., ... Limberger, R. P. 2016. Gender differences in biochemical markers and oxidative stress of rats after 28 days oral exposure to a mixture used for weight loss containing p-synephrine, ephedrine, salicin, and caffeine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52:59-68.
- 190 Bailey, S. A., Zidell, R. H., Perry, R. W. 2004. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint?. *Toxicologic pathology*, 32(4):448-466.

-
- 191 Yanez, M. M. F., Candela, E. 2003. Peso de los organos en relacion al peso corporal en ratones C57Bl/6 y NMRI/UCLA. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 13(5):389-403.
- 192 Devaraj, S., Singh, U., Jialal, I. 2009. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clinical chemistry*, 55(2):229-238.
- 193 Benozzi, S. F., Perruzza, F., Pennacchiotti, G. L. 2012. Proteína C reactiva: un marcador bioquímico asociado con el síndrome metabólico y la obesidad abdominal. *Revista argentina de cardiología*, 80(6):433-435.
- 194 Das, U. N. 2004. Metabolic syndrome X: an inflammatory condition? *Current hypertension reports*, 6(1):66-73.
- 195 Reaven, G. M. 1988. *Role of Insulin Resistance in Human Disease*. *Diabetes*, 37(12):1595–1607. <https://doi:10.2337/diab.37.12.1595>
- 196 Ford ES, Mokdad AH, Ajani UA, Liu S. Associations between concentrations of alpha and gamma- tocopherol on concentrations of glucose, glycosylated haemoglobin, insulin and C-peptide among US adults. *Br J Nutr* 2005;93(2):249-55.
- 197 Menon, V., Ram, M., Dorn, J., Armstrong, D., Muti, P., Freudenheim, J. L. Trevisan, M. 2004. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabetic medicine*, 21(12):1346-1352.
- 198 Clapés, S., Armas, D., Sánchez, D., Lemani, M., Márquez, I., Valdés, M. 2002. Algunos indicadores de estrés oxidativo en niños diabéticos. *Rev Cubana Farm*, 26(2):203-5.
- 199 Ceriello, A., Morocutti, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Moro, M., Damante, G., Viberti, G. C. 2000. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes*, 49(12):2170-2177.
- 200 Díaz Arce, D. 2006. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(3):0-0.
- 201 Mendoza, C., Márquez, Y. C., Matheus, N., Aranguren, A., El Abed, Y., López-Ortega, A. A. 2010. Correlación entre la concentracion de glucosa, hígado graso y estrés oxidativo hepático en Diabetes Mellitus. *Gaceta Cs Vet*, 15(2):58-63.
- 202 Castillo, R., Huerta, P., Carrasco, R., Rodrigo, R. 2003. Estrés oxidativo y daño renal. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 8(1), 44-53.
- 203 Sanaka, T., Nakano, Y., Nishimura, H., Shinobe, M., Higuchi, C., Omata, M., Sugino, N. 1997. Therapeutic effect of a newly developed antioxidative agent (OPC-15161) on experimental immune complex nephritis. *Nephron*, 76(3):315-322.
- 204 Peuchant, E., Delmas-Beauvieux, M. C., Dubourg, L., Thomas, M. J., Perromat, A., Aparicio, M., Combe, C. 1997. Antioxidant effects of a supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2):313-320.
- 205 Ongajooth, L., Ongajyooth, S., Likidlilid, A., Chantachum, Y., Shayakul, C., Nilwarangkur, S. 1996. Role of lipid peroxidation, trace elements and anti-oxidant enzymes in chronic renal disease patients. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaiht Thangphaet*, 79(12), 791-800.

-
- 206 López Martín, A., Carrillo Alcaraz, A. 2011. Estrés oxidativo y pancreatitis aguda. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 103(11):559-562.
- 207 Wallig, M. A. 1998. Xenobiotic metabolism, oxidant stress and chronic pancreatitis. *Digestion*, 59 (Suppl. 4):13-24.
- 208 Mcnamee, R., Braganza, J. M., Hogg, J., Leck, I., Rose, P., Cherry, N. M. 1994. Occupational exposure to hydrocarbons and chronic pancreatitis: a case-referent study. *Occupational and environmental medicine*, 51(9):631-637.
- 209 Vaquero-Raya, E. C., Molero-Richard, X. 2005. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y hepatología*, 28(8):473-484.
- 210 El-Hafidi, M., Franco, M., Ramírez, A. R., Sosa, J. S., Flores, J. A. P., Acosta, O. L., Cardoso-Saldaña, G. 2018. Glycine increases insulin sensitivity and glutathione biosynthesis and protects against oxidative stress in a model of sucrose-induced insulin resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- 211 Sertorio, M. N., César, H., de Souza, E. A., Mennitti, L. V., Santamarina, A. B., De Souza Mesquita, L. M., ... Pisani, L. P. 2022. Parental high-fat high-sugar diet intake programming inflammatory and oxidative parameters of reproductive health in male offspring. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 867127.
- 212 Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. 2009. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, 48(46):11108-11116.
- 213 Douglas, K. T. 1987. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 59:103-167.
- 214 Harrison, D. J., Kharbanda, R., Cunningham, D. S., McLellan, L. I., Hayes, J. D. 1989. Distribution of glutathione S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury. *Journal of clinical pathology*, 42(6):624-628.
- 215 Chance, B., Maehly, A. C. 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases.
- 216 Srivastava, S. K., Ansari, N. H. 1980. The peroxidatic and catalatic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 633(3):317-322.
- 217 Mora, Á. C., Aragón, D. M., Ospina, L. F. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*, 16(3):311-319.
- 218 Bermúdez, A., Céspedes, E., Romero, A., Peña, M., García, J. C. 2007. El estrés oxidativo en un modelo de isquemia y reperusión en hígado de ratas tratadas con aprotinina. *Rev Latinoamer Tecnol Extracorp*, 14(4):6-10.
- 219 Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 44(1):147-159.
- 220 Flohe, L. 1984. [10] Superoxide dismutase assays. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 93-104). Academic press.
- 221 Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Asada, K. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3):199-218.

-
- 222 Oberley, L. W., Buettner, G. R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer research*, 39(4):1141-1149.
- 223 Shohael, A. M., Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J., Islam, R., Paek, K. Y. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochemistry*, 41(5):1179-1185.
- 224 Kanth, B. K., Jnawali, H. N., Niraula, N. P., Sohng, J. K. 2011. Superoxide dismutase (SOD) genes in *Streptomyces peucetius*: effects of SODs on secondary metabolites production. *Microbiological research*, 166(5):391-402.
- 225 Ashry, N. A., Mohamed, H. I. 2011. Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to powdery mildew. *World J. Agric. Sci*, 7(1):78-85.
- 226 Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A. 1998. Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27(1):329-356.
- 227 Yoshikawa, S., Shimada, A. 2015. Reaction mechanism of cytochrome c oxidase. *Chemical reviews*, 115(4):1936-1989.
- 228 Galli, G. L., Richards, J. G. 2014. Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen. *Journal of Comparative Physiology B*, 184:285-302.
- 229 Capaldi, R. A. 1990. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annual review of biochemistry*, 59(1):569-596.
- 230 Delwing, D., Delwing, D., Chiarani, F., Kurek, A. G., Wyse, A. T. 2007. Proline reduces brain cytochrome c oxidase: prevention by antioxidants. *International journal of developmental neuroscience*, 25(1):17-22.
- 231 Duda-Chodak, A., Tarko, T. 2023. Possible side effects of polyphenols and their interactions with medicines. *Molecules*, 28(6):2536.
- 232 Wikström, M., Krab, K., Sharma, V. 2018. Oxygen activation and energy conservation by cytochrome c oxidase. *Chemical reviews*, 118(5):2469-2490.
- 233 Gutiérrez Zilli Saribel. 2020. Efecto de la intoxicación con plomo en ratas gestantes [Tesis para obtener el grado de ingeniería en biotecnología]. Universidad del Papaloapan
- 234 Feliciano Cruz Diego. 2019. Susceptibilidad a la intoxicación por plomo en roedores [Tesis para obtener el grado de licenciatura en ciencias químicas]. Universidad del Papaloapan
- 235 Ramírez Hernández, D. 2021. Efecto de las hormonas sexuales (17- β estradiol y progesterona) en la evolución del Infarto al Miocardio.
- 236 Talavera Mondragón, D. I. 2022. Efecto del estrés postnatal sobre el estrés oxidativo en hipocampo de ratas.
- 237 Gannon, M., Kulkarni, R. N., Hubert, M. T., Mauvais-Jarvis, F. 2018. Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. *Molecular metabolism*, 15:82-91.
- 238 Tian, H., Gao, Z., Wang, G., Li, H., Zheng, J. 2016. Estrogen potentiates reactive oxygen species (ROS) tolerance to initiate carcinogenesis and promote cancer malignant transformation. *Tumor Biology*, 37:141-150.

-
- 239 Li, J. J., Antonia Li, S. 1984. Estrogen-induced tumorigenesis in hamsters: roles for hormonal and carcinogenic activities. *Archives of toxicology*, 55:110-118.
- 240 Oruç, E. Ö. 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide biochemistry and physiology*, 96(3):160-166.
- 241 Céspedes Miranda, E. M., Hernández Lantigua, I., Llópiz Janer, N. 1996. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 15(2):0-0.
- 242 Zhu, Y. S., Yen, P. M., Chin, W. W., Pfaff, D. W. 1996. Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22):12587-12592.
- 243 Webb, P., Lopez, G. N., Greene, G. L., Baxter, J. D., Kushner, P. J. 1992. The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response. *Molecular endocrinology*, 6(2):157-167.
- 244 McCormick, M. L., Oberley, T. D., Elwell, J. H., Oberley, L. W., Sun, Y., Li, J. J. 1991. Superoxide dismutase and catalase levels during estrogen-induced renal tumorigenesis, in renal tumors and their autonomous variants in the Syrian hamster. *Carcinogenesis*, 12(6):977-984.
- 245 Unfer, T. C., Figueiredo, C. G., Zanchi, M. M., Maurer, L. H., Kemerich, D. M., Duarte, M. M. F., Emanuelli, T. 2015. Estrogen plus progestin increase superoxide dismutase and total antioxidant capacity in postmenopausal women. *Climacteric*, 18(3):379-388.
- 246 Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Picciolini, E., De Leo, V., Bonifazi, M., Bernabei, A. 2000. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *Journal of Endocrinology*, 167(3):447-452.
- 247 Nandi, A., Chatterjee, I. B. 1988. Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. *Journal of biosciences*, 13:305-315.