



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE Y CAPACIDAD
RENOPROTECTORA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
DE HOJAS DE *Cucurbita pepo* LINNAEUS EN
RATONES DIABÉTIZADOS

TESIS PROFESIONAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

JUAN DANIEL BARRERA OSORIO

DIRECCIÓN

DR. NAHIM SALGADO MEDRANO

CUERNAVACA MORELOS, MAYO DEL 2023

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
3.1 Metabolismo de Hidratos de Carbono (Glucosa)	4
3.1.1 Digestión y Absorción de Carbohidratos.....	4
3.1.2 Transportadores de Glucosa Localizados en Membranas Celulares.....	5
3.1.3 Metabolismo de Carbohidratos en Hígado.	6
3.1.4 Metabolismo de Carbohidratos en Riñón.	7
3.2 Regulación de la Glucosa Sanguínea a Través del Páncreas.	8
3.2.1 Anatomía y Fisiología del Páncreas.	8
3.2.2 Biosíntesis y Secreción de Insulina.	9
3.2.3 Acción de la Insulina en el Transporte de Glucosa.....	11
3.3 Antecedentes Históricos de la Diabetes Mellitus y Daño Renal.	12
3.4 Definición Actual de la Diabetes Mellitus.	13
3.5 Prevalencia Epidemiológica de la Diabetes Mellitus.....	14
3.6 Etiología de la Diabetes Mellitus.....	16
3.7 Clasificación de la Diabetes Mellitus.	17
3.7.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.	17
3.7.2 Diabetes Mellitus Tipo 2.	17
3.7.3 Diabetes Gestacional.	17
3.7.4 Otros Específicos.....	18
3.8 Diagnóstico de la Diabetes Mellitus.	18
3.8.1 Signos y Síntomas.	18
3.9 Complicaciones de la Diabetes Mellitus.....	19
3.9.1 Complicaciones Agudas.	19
3.9.2 Complicaciones Microvasculares.....	19
3.9.3 Complicaciones Macrovasculares.	19
3.10 Carga Económica de la Diabetes Mellitus en México.....	20
3.11 Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus.	21
3.12 Estreptozotocina (STZ) en la Inducción Química de Diabetes.	22

3.12.2 Mecanismo de Acción de la Estreptozotocina (STZ).....	23
3.13 Nefropatía Diabética.	24
3.13.1 Anatomía, Fisiología e Histología de Riñón.	24
3.13.2 Etiología de Nefropatía Diabética.	27
3.13.3 Fisiopatología de Nefropatía Diabética.	28
3.13.4 Determinación del Daño Renal Mediante la Observación Histológica.....	31
3.14 Hepatopatía Diabética.	33
3.14.1 Anatomía, Fisiología e Histología de Hígado.	33
3.14.2 Patología de la Hepatopatía Diabética.....	34
3.14.3 Etiología de Hepatopatía Diabética.....	35
3.14.4 Determinación del Daño Hepático Mediante la Observación Histológica.....	35
3.15 Las Plantas como Alternativa de Tratamiento en la Diabetes Mellitus.	38
3.16 Familia Cucurbitaceae y sus Principios Activos.	39
3.16.1 Descripción Botánica.....	39
3.16.2 Distribución Geográfica.....	39
3.16.3 Nutrientes y Fitoquímica.	40
3.17 Género <i>Cucurbita</i> y su Actividad Antidiabética.	40
3.18 Especie <i>Cucurbita pepo</i> Linnaeus.	42
3.18.1 Taxonomía.	43
3.18.2 Característica Vegetal.	43
3.18.3 Distribución Geográfica.....	44
3.18.4 Usos Etnomédico en Diversas Regiones del Mundo.....	44
3.18.5 Nutrientes y Componentes Fitoquímicos.....	45
3.18.6 Actividad Biológica de Fruto, Semilla y Hoja.	46
IV.- JUSTIFICACIÓN	48
V.- HIPÓTESIS	50
VI.- OBJETIVOS.....	50
6.1 Objetivo General.....	50
6.2 Objetivos Particulares	50
VII.- MATERIAL Y MÉTODO.....	51
7.1 Material Vegetal.	51
7.1.1 Recolecta del Material Vegetal.	51

7.1.2 Secado del Material Vegetal.	51
7.1.3 Molienda del Material Vegetal.	52
7.2 Preparación del Extracto Hidroetanólico de <i>Cucurbita pepo</i>	53
7.3 Ejecución de la NOM-062-ZOO-1999.	54
7.4 Evaluación del Efecto Hipoglucemiante en Ratones BALB/c.	54
7.5 Inducción Química de Diabetes Mellitus.	55
7.6 Administración del Extracto de <i>Cucurbita pepo</i> Linnaeus por Vía Oral.	55
7.7 Determinación de los Niveles de Glucosa en Sangre.	56
7.8 Proceso Histológico de Hígados y Riñones de Ratones Hiperglucémicos y Normoglucémicos.	56
7.9 Evaluación del Efecto Protector del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de <i>Cucurbita pepo</i> Linnaeus sobre Hígado y Riñón de Ratones Hiperglucémicos y Normoglucémicos.	59
VIII. RESULTADOS	61
8.1 Actividad Hipoglucemiante del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de <i>Cucurbita pepo</i> Linnaeus a Dosis de 300 mg/kg	61
8.2 Actividad Hipoglucemiante Preliminar del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de <i>Cucurbita pepo</i> Linnaeus a Dosis de 600 mg/kg	62
8.3 Comparación de la Actividad Hipoglucemiante Preliminar del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de <i>Cucurbita pepo</i> Linnaeus a Dosis de 300 y 600 mg/Kg	63
8.4 Obtención de los Órganos de Hígado y Riñón de los Diferentes Grupos de Ratones Experimentales	64
8.5 Evaluación Histológica Renal	65
8.6 Evaluación de Daño Renal	67
IX. DISCUSIÓN	69
X. CONCLUSIÓN	72
XI. PERSPECTIVAS	72
Referencias Bibliográficas	73

I. RESUMEN

Cucurbita pepo Linnaeus posee compuestos con actividad antidiabética en frutos y semillas. Sin embargo, el posible potencial efecto hipoglucemiante en las hojas de la planta ha despertado nuestro interés por este órgano. Esto último, debido principalmente a la necesidad actual con el desarrollo de tratamientos antidiabéticos más efectivos, accesibles y seguros de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. En este sentido, con el presente trabajo se profundizó en el estudio antidiabético y capacidad renoprotectora de las hojas de esta especie, a través de la evaluación de la acción hipoglucemiante de una dosis de 300 y 600 mg/Kg de extracto hidroalcohólico de hojas y el estudio histológico del sistema renal de ratones diabetizados tratados con la planta. De este modo, se logró observar una mayor eficacia preliminar a dosis de 600 mg/Kg del extracto hidroalcohólico de hojas y una acción hipoglucemiante desde dosis de 300 mg/Kg. Por otro lado, en la evaluación histológica renal de los ratones diabéticos tratados con 600 mg/Kg de extracto de la planta, se observó una significativa capacidad renoprotectora de la misma, mediante la observación y cuantificación de glomérulos íntegros visualizados en los cortes de tejido. Por lo que, con base en estos resultados se puede concluir que la especie vegetal *Cucurbita pepo* Linnaeus posee una capacidad antidiabética interesante, ligada a la prevención de complicaciones renales desarrolladas por la diabetes mellitus.

II. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por el desarrollo de una hiperglucemia crónica en sangre, que afecta el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Esto último, ocurre como consecuencia de una alteración en la secreción y/o sensibilidad a la insulina, la hormona encargada de mediar la internalización de glucosa disuelta en sangre. En la actualidad, la DM es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo con mayor impacto socioeconómico sobre países en desarrollo como México, donde se han estimado costos de hasta un 2.25 % del PIB (362, 859. 82 millones de pesos) para su atención y el tratamiento de complicaciones (nefropatías, complicaciones oftálmicas, infarto agudo al miocardio, neuropatía, etc. (*Barranza et al., 2015*). En este sentido, gran parte de la incidencia de la DM se relaciona con la prevalencia del sobrepeso y la obesidad, una condición que compromete aún más la calidad de vida de las personas. Por lo anterior, a nivel global se han estimado que 415 millones de adultos diabéticos, 318 millones manifiestan algún tipo de alteración en el metabolismo de los carbohidratos y para el año 2040 se esperan que alrededor de 642 millones de personas sean diabéticas (*Díaz, et al., 2016*).

Hoy en día, la acción de la insulina humana, fármacos hipoglucemiantes y antihiperglucemiantes han permitido en cierta medida el control de la DM, sin embargo, la falta de accesibilidad y asequibilidad a estos fármacos continúan siendo un obstáculo para el control glucémico constante particularmente en la población diabética de escasos recursos. Frente a esta situación, la Organización Mundial de la Salud recomienda a sus países miembros la atención de estas necesidades elementales, a través de la implementación de programas que promuevan el arraigo de hábitos saludables y el desarrollo de tratamientos más accesibles, asequibles y seguros, con la finalidad de prevenir y contrarrestar respectivamente, de manera oportuna afectaciones económicas y de salud por la enfermedad durante las próximas décadas (*Federación Internacional de Diabetes, 2017*).

La medicina tradicional a base de plantas ha demostrado su efectividad en diferentes enfermedades a través de numerosos estudios farmacológicos y actualmente, es considerada como una de las alternativas más prometedoras en el tratamiento de la diabetes mellitus gracias a su amplia accesibilidad a nivel mundial. En este sentido, *Cucurbita pepo* Linnaeus es una especie

vegetal que ha demostrado diversos mecanismos de acción antidiabética y en estudios recientes, nuestro grupo de trabajo ha logrado demostrar su efecto hipoglucemiante a dosis de 300 mg/Kg, junto a un efecto pancreoprotectora a partir de la preparación de un extracto hidroalcohólico de hojas de la planta, administrado por vía oral en ratones diabetizados. En este sentido, la obtención de estos resultados nos ha llevado al desarrollo del presente trabajo, en el que se tuvo como objetivo principal, profundizar en la efectividad hipoglucemiante y evaluar la capacidad renoprotectora del extracto hidroalcohólico de hojas de la planta administrado una dosis de 600 mg/Kg en ratones diabetizados. En este contexto, el estudio renoprotector ha sido considerado, debido a que la nefropatía diabética (ND) es una de las principales complicaciones de la diabetes mellitus, que trae consigo la presencia de una proteinuria, desarrollo de hipertensión arterial e insuficiencia renal crónica (IRC) (Macía, et al., 2001). Al mismo tiempo, con la presente investigación se busca atender las recomendaciones descritas por la OMS referente con a la búsqueda de alternativas más efectivas para la prevención y control de diabetes mellitus.

III. ANTECEDENTES

3.1 Metabolismo de Hidratos de Carbono (Glucosa).

La glucosa es un monosacárido de seis átomos de carbono (hexosa) que presenta múltiples funciones fisiológicas (Figura 1). Estas últimas, van desde formar parte de la composición estructural de membranas celulares, moléculas señalizadoras, receptores, así como la de brindar energía para diferentes reacciones metabólicas. Durante el metabolismo normal en los organismos que la consumen, los mecanismos homeostáticos que regulan la internalización de esta molécula se encargan de controlar sus niveles en sangre a partir de proteínas sintetizadas por el páncreas (insulina y glucagón) y proteínas localizadas en la membrana de las células de todo el cuerpo (receptor de insulina, y transportadores de glucosa) (Guyton & Hall, 2011).

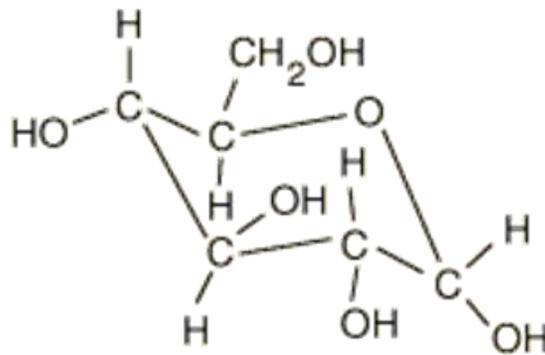


Figura 1. Estructura en silla de la molécula de glucosa.

3.1.1 Digestión y Absorción de Carbohidratos.

En los organismos heterótrofos la digestión es un mecanismo que permite la degradación y transformación de moléculas complejas a moléculas más pequeñas. Este proceso consiste en la ruptura enzimática de diferentes fuentes de carbono que incluyen: glúcidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos a través de enzimas digestivas presentes en las secreciones salivales, del jugo pancreático y las células de las vellosidades intestinales. En el caso de los carbohidratos complejos la digestión inicia con la participación de la amilasa salival que actúa sobre almidones desdoblado su estructura de polisacárido a moléculas más pequeñas denominadas disacáridos. Sin embargo, los alimentos permanecen poco tiempo en la boca, por la que esta fase constituye solo una parte

del proceso de su digestión. Con la llegada de los alimentos al estómago la amilasa salival se desactiva por la acción del ácido gástrico, posteriormente los disacáridos pasan al intestino delgado donde se encuentra con la amilasa pancreática y glucosidasas las cuales actúan hasta que los glúcidos puedan ser absorbidos en forma de monosacáridos a través de las vellosidades intestinales. Una vez que los monosacáridos (glucosa, galactosa y fructosa) penetran en las células intestinales, son absorbidos por un mecanismo de transporte activo secundario dependiente de sodio, en la cual el transporte activo de sodio, que provee la energía necesaria para absorber la glucosa. No obstante, la glucosa una vez absorbida por los enterocitos pasa al interior del resto de las células con cierta libertad por mecanismos de difusión facilitada (*Guyton & Hall, 2011*).

3.1.2 Transportadores de Glucosa Localizados en Membranas Celulares.

Para el ingreso de glucosa se requiere de proteínas transportadoras posicionadas en las membranas celulares. Actualmente se describen dos sistemas de transporte de glucosa: las proteínas GLUT, que actúan mediante el mecanismo de difusión por gradiente de concentración (Tabla 1), y proteínas dependientes de gradientes de concentraciones de sodio SGLUT (Tabla 2), que controlan el transporte de glucosa de varios tejidos localizados en la membrana luminal de las células epiteliales y renales (túbulo contorneado proximal en el segmento S1 y S2) (*Segura & Ruilope, 2013*).

Tabla 1. Transportadores de Glucosa "GLUT" (*Sherpherd & Kahn, 1999*)

Transportador	Función	Lugar de expresión
GLUT 1	Transportador constitutivo de glucosa	Cerebro, eritrocitos, placenta, riñones y células del lente del cristalino
GLUT 2	Sensor de las células β pancreáticas para la liberación de insulina en presencia de \uparrow glucosa	Células beta pancreática, riñón, epitelio del intestino delgado e hígado
GLUT 3	Transportador de alta afinidad para la glucosa	Neuronas y placenta
GLUT 4	Transporte de glucosa estimulado por la insulina	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo
GLUT 7	Transporte de glucosa por microsomal	Hígado
GLUT 8	Transporte de glucosa regulada hormonalmente	Nivel testicular en un adulto

Tabla 2. Transportadores de Glucosa Dependientes de Sodio "SGLT" en Tejido Renal (Segura & Ruilope, 2013)

Transportador	Función	Lugar de Expresión
SGLUT 1	Reabsorción de glucosa no reabsorbida por SGLT 2	Intestino y túbulo proximal renal (segmento S3)
SGLUT 2	Reabsorción de la mayor parte de la glucosa	Túbulo proximal renal (segmentos S1 y S2)
SGLUT 4	?	Intestino, riñón, hígado, cerebro, pulmón y páncreas
SGLUT 5	?	Cerebro, riñón, intestino

3.1.3 Metabolismo de Carbohidratos en Hígado.

Una de las razones, por las que la molécula de glucosa es internalizada por organismos heterótrofos es porque a partir de su degradación en el interior celular se conforman moléculas de alta energía y si está, no logra alcanzar este catabolismo puede ser almacenada en forma de glucógeno (un gran polímero de glucosa) en el interior de células hepáticas, funcionando como reserva de energía. Las células hepáticas pueden alojar hasta un 58% de su peso en glucógeno, presentando mayor especialización en el almacenamiento de este polímero que las células musculares, las cuales llegan a albergar hasta un 13% en su interior. La conversión de este monosacárido en un compuesto precipitado de elevado peso molecular (glucógeno) facilita el depósito de grandes cantidades de hidratos de carbono sin alterar la presión osmótica de los líquidos extracelulares, ya que de lo contrario podría causar estragos en las relaciones osmóticas entre los líquidos intracelular y extracelular. La glucogenogénia es un proceso de transformación de glucosa y otros compuestos (ácido láctico, el glicerol, el ácido pirúvico y algunos aminoácidos desaminados) en glucógeno, y su descomposición mediante la fosforilación, permite obtener glucosa libre, por un proceso denominado glucogenólisis. Para ambos procesos es necesaria la participación de diferentes enzimas que actúan sobre diferentes reacciones químicas como se ilustra en la figura 2 (Guyton & Hall, 2011).

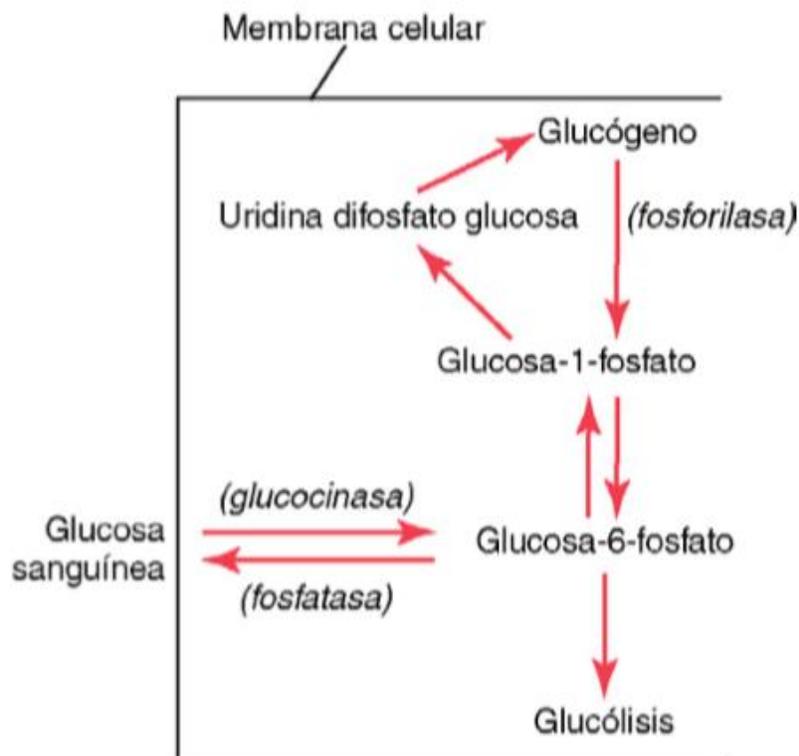


Figura 2. Reacción química de glucogenogénesis y glucogenólisis (Guyton & Hall, 2011).

3.1.4 Metabolismo de Carbohidratos en Riñón.

El riñón participa de manera importante en el metabolismo de los carbohidratos a partir del gluconeogénesis, la cual consiste en la síntesis del novo de glucosa a partir de precursores tales como el lactato, glutamina, alanina y glicerol. La contribución renal de glucosa corporal es de aproximadamente de un 20% y es utilizada fundamentalmente en la médula renal, la cual tiene una importante actividad fosforilativa y glucolítica. Sin embargo, la liberación de glucosa a la circulación no puede llevar a cabo desde las células medulares ya que carecen de las enzimas glucosa-6-fosfatasa involucradas en generar glucosa libre. Esta situación es solucionada por las células de la corteza renal, las cuales sí disponen de dicha enzima. En el riñón el transportador SGLUT2 localizado en túbulo proximal distal es el responsable de la reabsorción del 90% de la glucosa filtrada por el glomérulo y el 10% restante a través del transportador SGLT1 expresado, en la superficie luminal del segmento S3 de los túbulos proximales. El papel predominante del transportador GLUT2 en la reabsorción renal de glucosa, ha determinado que su bloqueo selectivo

sea una estrategia beneficiosa en pacientes con diabetes, ya que permite disminuir los niveles de glucosa mediante la su excreción por la orina. Normalmente la tasa de filtrado glomerular (TFG) de glucosa, es reabsorbida cuando la glucemia es < 180 mg/dl y a medida que la concentración plasmática de glucosa aumenta, la carga de glucosa filtrada se incrementa de forma lineal alterando su reabsorción. Cuando la glucemia excede dicha concentración, el riñón empieza a excretar glucosa en la orina y, dicha concentración es conocida como el umbral renal de glucosa. En una hiperglucemia sostenida como en la diabetes mellitus, la reabsorción renal de glucosa contribuye al mantenimiento de dicha condición, así como en la glucotoxicidad, relacionada con la paulatina mecanismo pérdida de la función de las células beta pancreáticas, que constante e incesantemente produce insulina para contrarrestar los niveles elevados de glucosa en sangre (*Segura, et al., 2013*).

3.2 Regulación de la Glucosa Sanguínea a Través del Páncreas.

3.2.1 Anatomía y Fisiología del Páncreas.

El páncreas es un órgano colocado transversalmente por delante de los vasos pre vertebrales y del riñón izquierdo, desde la segunda porción del duodeno hasta el bazo. Mide aproximadamente 15 cm de longitud y pesa de 70 a 80 g en humanos. Es un órgano de color rosado en estado fresco y de una consistencia bastante firme. El páncreas presenta una función glandular exocrina por parte de las células acinares productoras de enzimas digestivas y endocrina por parte de las células presentes en los islotes de langerhans. Es una glándula productora de insulina, una hormona responsable de mantener el equilibrio de glucosa en sangre (*Delmas & Rouvière, 1988*).

De acuerdo con la literatura, el páncreas humano cuenta con 1 a 2 millones de islotes de langerhans organizados en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas, y presenta tres tipos fundamentales de células; las células beta que representan casi el 60% de la totalidad y secretan insulina; las células alfa, que componen casi el 25% del total y secretan glucagón; y las células delta, que representan el 10% y secretan somatostatina como se observa en un corte transversal de este órgano ilustrado en la figura 3 (*Guyton & Hall, 2011*).

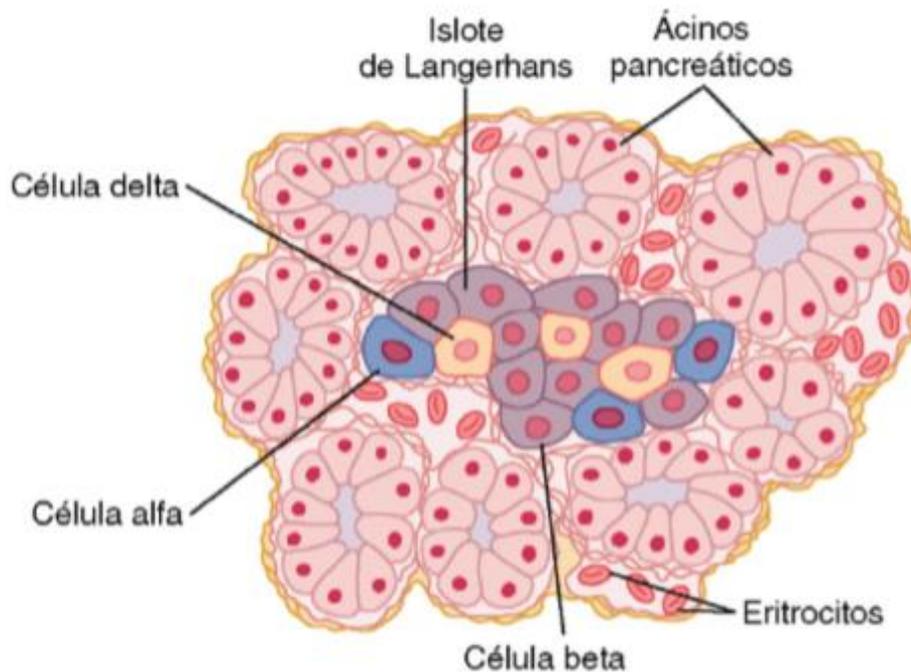


Figura 3. Anatomía y fisiológica de un islote de langerhans pancreático (Guyton & Hall, 2011).

3.2.2 Biosíntesis y Secreción de Insulina.

La insulina es una proteína pequeña, que se compone de dos cadenas de aminoácidos, unidas entre sí por enlaces disulfuro. Su secreción se asocia con la abundancia energética, es decir cuando se dispone de glucosa. Esta proteína es sintetizada, a través de los ribosomas acoplados al retículo endoplásmico (RE), en los cuales, se traduce el ARN de insulina y forman una preproinsulina, que posteriormente sufre modificaciones post traduccionales por un corte proteolítico, generando la proinsulina (Figura 4). La mayor parte de proinsulina sigue escindiéndose en el aparato de Golgi para finalmente obtener la formación de insulina, compuesta por la cadena A y B conectada por uniones disulfuro la cadena C, y péptidos de conexión (péptidos C). Por último, la molécula de insulina madura y el péptido C, se almacenan y se segregan de forma simultánea en los gránulos secretores de las células beta (Guyton & Hall, 2011).

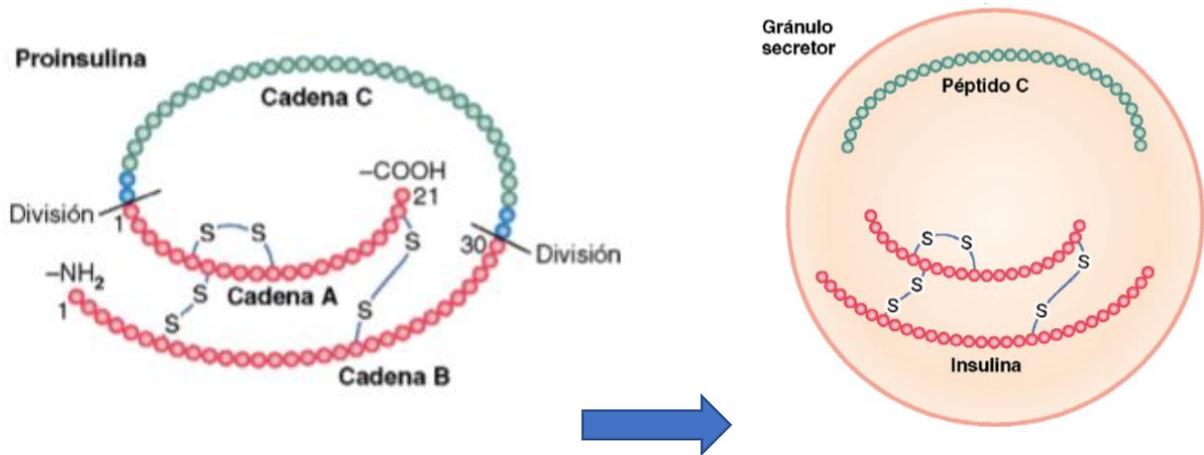


Figura 4. Esquema de la molécula proinsulina humana (Guyton & Hall, 2011).

El mecanismo de secreción de insulina es activado en concentraciones de glucosa que sobrepasan los 70 mg/dL. Las células beta poseen un gran número de transportadores (GLUT-2), que permiten la entrada de glucosa, proporcional a su concentración en la sangre dentro de límites fisiológicos. Otros nutrientes, tales como determinados aminoácidos, también pueden metabolizarse en las células beta, donde incrementan las concentraciones de ATP, procesos de glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa de igual manera incrementan e inhibe la actividad de un conducto de K^+ sensible a ATP y como consecuencia, se induce la despolarización de la membrana de la célula beta, lo que abre los conductos de Ca^{2+} dependientes de voltaje ($-30 > 70$ mV), de tal manera que se estimulan la fusión de vesículas que contienen insulina, que determina la secreción de esta hormona (Figura 5) (Guyton & Hall, 2011).

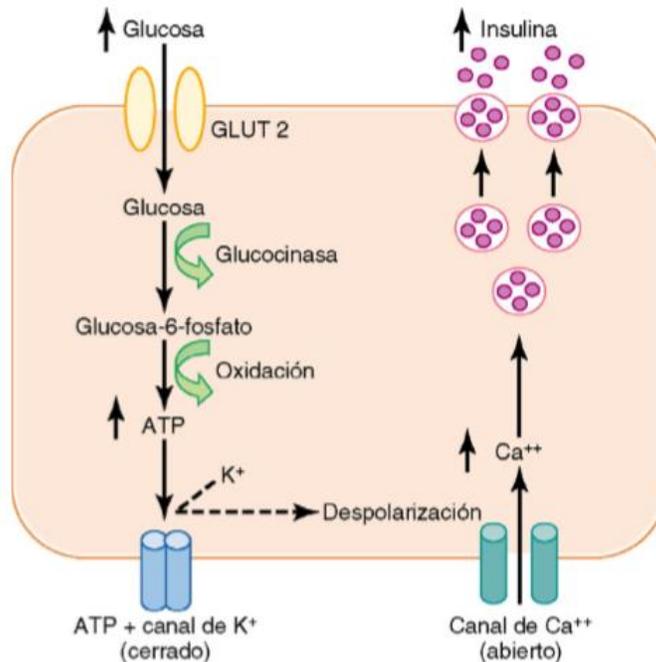


Figura 5. Mecanismos de estimulación de la secreción de insulina en las células β del páncreas por la glucosa (Guyton & Hall, 2011).

3.2.3 Acción de la Insulina en el Transporte de Glucosa.

La mayor parte de insulina en la sangre circula de forma no ligada; su semivida plasmática es de unos 6 min por término medio y desaparece de la circulación después de 10 a 15 min. Una vez que la insulina ha ejercido su función en la internalización de glucosa esta es degradada por efecto de la enzima insulinasa, presente en el hígado, riñones, músculos y de forma más discreta en casi todos los tejidos. La insulina una vez fijada a su receptor estimula la actividad de la tirosina cinasa, lo que con lleva a la autofosforilación del receptor y el reclutamiento de IRS (Sustratos del Receptor de Insulina), que son moléculas de señalización (Figura 6). Finalmente se desencadena los transportadores de glucosa que se desplazan a la membrana celular para favorecer la entrada de este monosacárido al interior de la célula (Guyton & Hall, 2011).

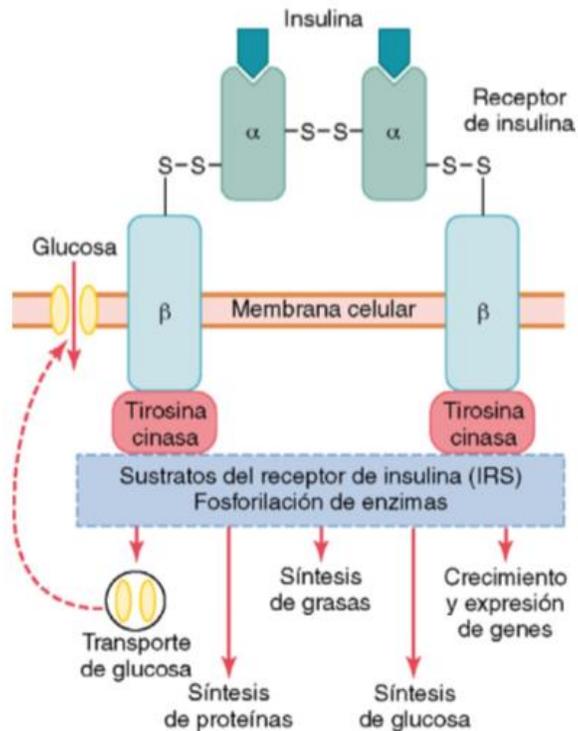


Figura 6. Esquema del receptor de insulina y autofosforilación de la subunidad β del mismo e induce una actividad tirosina cinasa (Guyton & Hall, 2011).

3.3 Antecedentes Históricos de la Diabetes Mellitus y Daño Renal.

Hoy en día, los indicios históricos de la existencia de la Diabetes Mellitus datan desde el siglo XV antes de Cristo. Pero no fue hasta el siglo I después de Cristo cuando se encontraron evidencias fehacientes de su existencia. Areteo de Capadocia, médico turco (81-138 d. C) refirió como una de los principales síntomas de la enfermedad a la eliminación de orina exagerada, sin embargo, el escritor romano Celso fue el primero en describir la enfermedad como un flujo de orina consecuencia del fallo renal sin presentar dolor y acompañada de una fuerte demacración, asignándole el nombre *urinae nimia profusio*. Con el paso del tiempo se identificaron síntomas que caracterizaban a los diabéticos, como Galeno (siglo II d. de C.), que describió a la enfermedad como la insaciable necesidad de beber (*dipsacon de dípsa 'sed'*) utilizando nombres como diarrea de orina debido a una debilidad de los riñones. En ese momento, el concepto de diabetes era difícil de comprender y el médico inglés Thomas Willis en 1674 acuñó a la expulsión de orina azucarada, como diabetes azucarada ya que observó el color y el sabor similar a la miel. Cabe mencionar que

este término se empleaba más propiamente con el significado que recoge la precisa definición de Manuel Hurtado de Mendoza en 1840 designando con ese nombre a una enfermedad caracterizada por un aumento considerable y alteración en la secreción de orina, acompañada de sed viva y enflaquecimiento progresivo (*Díaz, 2004*).

Los primeros trabajos experimentales relacionados con el metabolismo de los glúcidos fueron realizados por Claude Bernard quien descubrió, en 1848, el glucógeno hepático y provocó la aparición de glucosa en la orina. Por otro lado, en la segunda mitad del siglo XIX, Griesinger (1859) y Seeger (1875) describieron por primera vez la asociación clínica entre Diabetes Mellitus, proteinuria y deterioro de la función renal, así como Armani y Ebstein que describieron depósitos de colágeno en el interior de las células epiteliales tubulares de pacientes diabéticos y Klimmestiel y Wilson en 1936 que encontraron lesiones nodulares en tejido renal de pacientes diabéticos que presentaban proteinuria nefrótica, edema e hipertensión (*Moreno, et al., 2000*).

3.4 Definición Actual de la Diabetes Mellitus.

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónico degenerativa relacionada a la alteración de la secreción de insulina o pérdida de la sensibilidad a la misma, que favorece el desarrollo de una hiperglucemia crónica, traducida en complicaciones microangiopáticas (renales y oculares), así como macroangiopáticas (afecciones de arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía). Existen múltiples procesos fisiopatológico involucrados durante la enfermedad que van desde la destrucción autoinmunitaria de las células β pancreáticas hasta alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina. El efecto esencial de la ausencia de insulina o de la resistencia a la misma sobre el metabolismo de la glucosa, consiste en que las células insulino dependientes, no absorben ni utilizan de modo eficiente la glucosa, teniendo como consecuencia un incremento de la glucemia sanguínea, un descenso progresivo de la utilización celular de glucosa y un aumento en la utilización de las grasas y de los depósitos de proteínas (*Islas & Revilla, 2013*).

3.5 Prevalencia Epidemiológica de la Diabetes Mellitus.

La Diabetes Mellitus ha sido objeto de innumerables estudios para determinar los factores que favorecen la presencia de esta patología y entender su selectividad sobre las poblaciones afectadas. De acuerdo con la literatura la aparición y desarrollo de la enfermedad está ligado a un conjunto de factores que desencadenan su sintomatología en donde elementos tales como la edad, el sexo, la raza y el estilo de vida constituyen una señal de alerta ante la probabilidad de padecer este trastorno (López, *et al.*, 2005). Cabe señalar que se ha convertido rápidamente en la epidemia del siglo XXI de forma creciente y en un gran reto de salud global, debido al sedentarismo, obesidad y nuevas tendencias alimentarias. En los registros del año 2017 se reportan 425 millones de personas en el mundo con esta enfermedad con una prevalencia del 8.8 % de la población con edades entre 20 y 79 años, de las cuales un 75 % habitan en países de ingresos medios y bajos (Figura 7). Si estas tendencias continúan para el año 2045 se espera un incremento a 629 millones de personas con diabetes en el mundo (Federación Internacional de Diabetes, 2017).

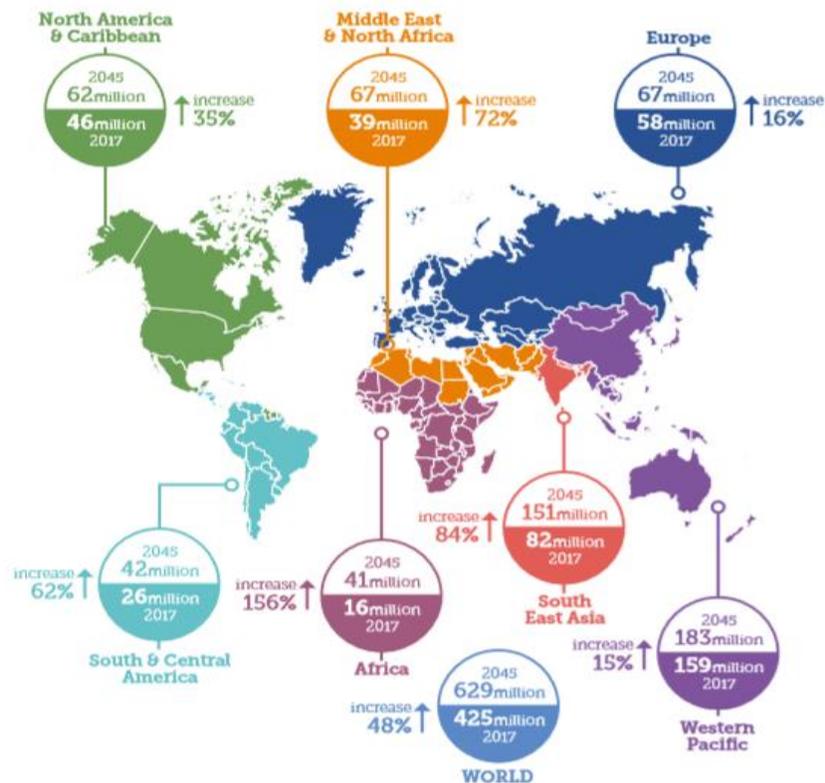


Figura 7. Prevalencia de número de personas diabéticas entre 20 y 79 años de edad en las distintas regiones del mundo (FID, 2017).

En México, las estimaciones existentes son muy variables con cálculos de costos de atención por paciente que van desde 700 hasta 3,200 dólares anuales, lo que presenta una carga económica mayor que el presupuesto destinado para la atención de los diabéticos. Además de la edad, la presencia de obesidad abdominal, hipertensión y de bajos niveles de colesterol de alta densidad (HDL), se asocian con una mayor ocurrencia de diabetes, por lo que para países como México con altos índices de obesidad es un problema serio de salud pública que se refleja en el impacto económico y social (*Hernández, et al., 2013*). Entre los países del mundo con mayor prevalencia de diabetes en el año 2017, México ocupa el quinto lugar con 12.5 millones de personas diabéticas entre 20 y 79 años de edad, con predicciones para el año 2045 que lo posicionarán en el cuarto lugar a nivel global, datos registrados por la federación de diabetes (Tabla 3) (*Federación Internacional de Diabetes, 2017*).

2017 Tabla 3. Número de Personas con Diabetes entre 20 -79 Años (FID, 2017) 2045

No.	País	Número de personas con diabetes	No.	País	Número de personas con diabetes
1	China	114.4 M	1	China	134.3 M
2	India	72.9 M	2	India	119.8 M
3	E.U.	30.2 M	3	E.U.	35.6 M
4	Brasil	12.5 M	4	México	21.8 M
5	México	12.0 M	5	Brasil	20.3 M
6	Indonesia	10.03 M	6	Egipto	16.7 M
7	Rusia	8.5 M	7	Indonesia	16.7 M
8	Egipto	8.2 M	8	Pakistán	16.1 M
9	Alemania	7.5 M	9	Bangladesh	13.7 M
10	Pakistán	7.5 M	10	Turquía	11.2 M

Los factores de riesgo asociados al metabolismo son causas de enfermedad y lesiones potencialmente modificables, para la población del estado de Morelos, de acuerdo a la información de la carga de la enfermedad en el año 2016 por la Secretaria de Salud, son: glucosa elevada en

ayunas, colesterol alto, presión alta, índice de masa corporal alto y función renal deteriorada, teniendo como antecedente un registró de mayor número de incidencia en padecer la enfermedad, presentándose en hombres (654.83 de cada 100 mil) y en mujeres (745.88 de cada 100 mil), en una prevalencia de diabetes por diagnostico medico previo a nivel nacional de 10.2- 12.3 % (*ENSANUT, 2012*).

3.6 Etiología de la Diabetes Mellitus.

La combinación de la ingesta calórica y la falta de ejercicio con llevan a una vida sedentaria de que propicia el desarrollo de obesidad, fundamentalmente centripeta o abdominal, metabólicamente activa. El tejido adiposo libera mediadores inflamatorios como interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) o ácidos grasos libres que aumentan la resistencia insulínica a nivel hepático, y de tejidos insulino dependientes favoreciendo el desarrollo de estrés oxidativo y el deterioro sistemático del cuerpo. En esta condición el ejercicio físico es recomendable para el ahorro, ya que facilita el consumo de glucosa estimulando la translocación de transportadores GLUT 4 de tejidos insulino dependientes (*Rodríguez, et al., 2012*).

Por otro lado, las infecciones víricas se relacionan con el desarrollo de DM tipo 1. Este tipo de diabetes se relaciona con la destrucción de todo o una parte importante de islotes pancreáticos, lo cual desencadena un defecto secretor de insulina que incapacita la internalización de glucosa al resto de las células y vuelve a estos pacientes dependientes de insulina (*Díaz & Delgado, 2016*).

Actualmente se han identificado múltiples loci genéticos, cuyos polimorfismos se han asociado a una incidencia aumentada de diabetes, sin embargo, a pesar de la multitud de genes implicados, se tiene poco conocimiento acerca de los factores genéticos relacionados con la etiología. Los genes implicados pueden afectar desde la secreción de insulina, hasta el desarrollo pancreático. Hoy en día, no se conoce el mecanismo concreto que desencadena la diabetes tipo 1 en el proceso autoinmune, no obstante, el mimetismo celular (antígenos que compartirían secuencias de aminoácidos con la célula beta), la alteración del mecanismo de tolerancia y la sensibilidad de las células beta a los radicales libres o al daño inducido por citoquinas confiere una mayor predisposición a padecer esta enfermedad (*Rodríguez, et al., 2012*).

3.7 Clasificación de la Diabetes Mellitus.

En 1979 el National Diabetes Data Group (NDDG) de los Institutos Nacionales de Salud en EUA, clasificó la diabetes en dos grupos principales: los dependientes de insulina y las no dependientes, sin embargo, carente de evidencias científicas en cuestiones de la etiología se actualiza la información en julio de 1997 por un Comité de Expertos patrocinado por la American Diabetes Association (ADA) junto con el apoyo del Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1980. La clasificación de la DM, de acuerdo a los criterios basados en su etiología sustentadas hasta la fecha: DM1, DM2, DG y otros específicos como problemas genéticos (*Santiago, 2000*).

3.7.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.

Se produce por la destrucción de células β pancreáticas, lo que con lleva a un déficit absoluto de insulina y la necesidad de su administración desde el inicio de la enfermedad. Se distinguen 2 subtipos: DM mediada por inmunidad (1A) e idiopática (1B). De acuerdo con las estadísticas un 45% de los casos se diagnostican antes de los 10 años de edad y un segundo pico entre los 10-14 años (*Pallardo, 2004*).

3.7.2 Diabetes Mellitus Tipo 2.

Se caracteriza por la resistencia a la acción de la insulina y alteración relativo en la secreción de esta hormona. Representa entre el 90-95% de todos los casos diagnosticados de diabetes y la mayoría de los pacientes que la padecen son obesos (*González, et al., 2008*).

3.7.3 Diabetes Gestacional.

Es un trastorno de la tolerabilidad a los hidratos de carbono que aparece en la segunda mitad del embarazo y que se acompaña del aumento de las complicaciones perinatales (macrosomía, cesáreas, distocia de hombros, parálisis del plexo braquial) y maternas (cesárea, hipertensión arterial, etc.). Esta condición resulta de la combinación de un aumento de la masa adiposa materna y un efecto anti-insulínico de las hormonas que produce la *placenta* (*Bougherara, et al., 2018*).

3.7.4 Otros Específicos.

El 5% de los casos de diabetes se producen en sujetos menores de 25 años no obesos, y se transmiten de forma autosómica dominante debido a mutaciones en genes diferentes que codifican enzimas glucolíticas o factores de transcripción de la célula β . Las formas más frecuentes en niños son debidas a una mutación del gen de la glucoquinasa localizado en el cromosoma 7 (MODY 2) y en jóvenes ubicado en el cromosoma 12 (MODY 3). Defectos genéticos de acción de la insulina, alteraciones del páncreas exocrino que afectan extensamente al parénquima hepático como pancreatitis, trauma, pancreatectomía, hemocromatosis o fibrosis quística pueden dar lugar al desarrollo de diabetes habitualmente dependiente de la insulina. Por otro lado, las enfermedades endocrinológicas que suponen el exceso en la producción de hormonas contra reguladoras se asocian al desarrollo de diabetes: síndrome de Cushing, hipertiroidismo, acromegalia o somatostatina (Rodríguez, *et al.*, 2012).

3.8 Diagnóstico de la Diabetes Mellitus.

En la actualidad, se utilizan tres parámetros para el diagnóstico de diabetes mellitus: la glucemia plasmática basal igual o superior a 126 mg/dl (7,0 mmol/l), la sobrecarga oral de glucosa (SOG) igual o superior a 200 mg/dl (11,1 mmol/l) y el valor de hemoglobina glicosilada (A1c) igual o superior a 200 mg/dl (11,1 mmol/l), o una cifra de A1c igual o mayor de 6,5% (*Federación Internacional de Diabetes, 2017*).

3.8.1 Signos y Síntomas.

En la mayoría de los casos de pacientes diabéticos, el único signo visible que se diagnostica es cuando el nivel de glucosa plasmática en ayuno, supera el valor de 126 mg/dL crónicamente este signo es observable cuando el diagnóstico de DM ya está establecido. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, algunos de estos síntomas son: la poliuria (excreción anormal de orina), polidipsia (consumo excesivo de agua) y polifagia (consumo excesivo de alimentos), por mencionar los más relevantes.

3.9 Complicaciones de la Diabetes Mellitus.

3.9.1 Complicaciones Agudas.

La cetoacidosis surge como consecuencia del consumo únicamente de ácidos grasos, en la que además está combinada con un exceso de hormonas contrainsulares (glucagón, catecolaminas, cortisol y hormona del crecimiento). Está asociada generalmente a pacientes de diabetes de tipo 1, sin embargo, también ocurren en pacientes con diabetes tipo 2. Otra complicación aguda es la superación del límite renal para la reabsorción de glucosa (sobre los 180 mg/dl) que se va traduciendo en glucosuria y diuresis osmótica, fundamentalmente sodio y potasio, así como magnesio, cloro y fosfatos, que conlleva a un estado de deshidratación progresivo (*Martínez, et al., 2012*).

3.9.2 Complicaciones Microvasculares.

Las complicaciones microvasculares de la DM favorecen el desarrollo de Retinopatía, la cual es considerada la segunda causa de ceguera en el mundo occidental y la más común entre las personas de 30 y 69 años. Esta complicación consiste en una disminución de la sensibilidad a la luz de células de la retina, que tiene como consecuencia la disminución progresiva de la visión, esto se debe a que las células del cristalino tienen una membrana impermeable al sorbitol, sustancia que incrementa intracelularmente con la entrada desmedida de glucosa. Por otro lado, Alrededor del 20-30% de los pacientes diabéticos presentan evidencias de Nefropatía con una mayor incidencia sobre todo en los diabéticos tipo 2, mientras que en el tipo 1 dicha incidencia tiende a estabilizarse o incluso a descender. La hiperglucemia también puede llegar a causar daño al sistema nervioso mediante los mecanismos de trastornos metabólicos y, en consecuencia, los impulsos transmitidos se alteran, apareciendo trastornos musculares y de sensibilidad, teniendo como resultado el desarrollo de padecimiento como la Neuropatía Diabética (*Pérez, et al., 2016*).

3.9.3 Complicaciones Macrovasculares.

Las complicaciones macrovasculares, están manifestadas clínicamente como cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, la enfermedad vascular cerebral y la insuficiencia arterial, que son el resultado de una combinación de alteraciones específicas de la diabetes, tal es el caso como la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, los estados pro inflamatorios,

protrombóticos, la disfunción endotelial, la aterogénesis acelerada y de la aceleración del proceso de arteriosclerosis. Las principales manifestaciones clínicas de la arteriosclerosis es la cardiopatía isquémica (CI), los accidentes cerebrovasculares (AVE) y la insuficiencia arterial periférica (IAP) (Mediavilla, 2000).

3.10 Carga Económica de la Diabetes Mellitus en México.

La carga económica generada por diabetes se establece en costos directos asociados al gasto en atención médica durante el tratamiento y complicaciones (incluyendo servicios médicos y medicamentos), y costos indirectos relacionados con la mortalidad prematura y discapacidad. Actualmente la carga económica de la DM es de 362,859.82 millones de pesos, es decir 2.25% del Producto Interno Bruto (PIB), de los cuales 179,495.3 millones representan costos directos y 183,364.49 millones de pesos costos indirectos. El costo de atención médica de las complicaciones representa el 87% de los costos directos, para el sistema de salud, esto refuerza la necesidad de evitar o posponer lo más posible la presencia de complicaciones en estos pacientes y su evolución a fases severas. Por otra parte, en los costos indirectos el mayor costo está asociado a mortalidad prematura en un 72.5% (Tabla 4) (Barraza, et al., 2015).

Tabla 4. Carga Económica de la Diabetes Mellitus (Barraza, et al., 2015)

Costos directos			Costos indirectos		
Rubro	Costo en Millones	Porcentaje	Rubro	Costo en millones	Porcentaje
Medicamentos	4,316.7	2.4	Muerte prematura	132,990.9	72.5
Atención medica	17,654.9	9.8	Ausentismo laboral	689.904	0.4
Transporte	921.3	0.5	Incapacidad laboral	16,361.4	9.9
Complicaciones	156,602.4	87.2	Invalides	16,571.7	9.0
			Presentismo	16,750.4	9.1
Total	179,495.3	100	Total	183,364.49	100

La falta de detección oportuna y bajos niveles de control de la diabetes han resultado numerosas complicaciones de salud y una baja calidad de vida lo que conlleva al incremento económico para su tratamiento. Cifras recientes señalan que, un diagnóstico de diabetes en adultos, 46.9% presentan hipertensión, 47.6% disminución de la vista, 13.9% experimenta daños en la

retina, y 6.6% pérdida de la vista. Finalmente, el 2.8% ha tenido un infarto y 1.4% está bajo tratamiento de diálisis por enfermedad renal crónica (Hernández, et al., 2013).

3.11 Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus.

Para el tratamiento de la DM se emplean numerosas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos, tanto hipoglucemiantes como antihiperoglucémicos, incluyendo la insulina. Los factores etiopatogénicos que inducen hipoinsulinemia o resistencia a la insulina son múltiples y pueden coexistir simultáneamente. Los antidiabéticos orales con mayor uso encontramos los secretagogos de insulina (glibenclamida), los sensibilizadores a la insulina (metformina), agonistas de los receptores activados por proliferadores peroxisómico de tipo γ (PPAR- γ) en tejido muscular y adiposo (rosiglitazona), análogos del péptido similar al glucagón (GLP1) (exenetida), así como los inhibidores de las dipeptidil peptidasas (gliptinas), del cotransportador renal de sodio y glucosa (glifozinas) e inhibidores de las alfa-glucosidasas (IAGs) como acarbosa y miglitol, por mencionar los más relevantes (Tabla 4). Sin embargo, a pesar del gran auge farmacológico de las últimas dos décadas, la diabetes sigue siendo la principal causa de ceguera por enfermedad no ocular, así como de insuficiencia renal crónica por encima de 40 años y de amputación de origen no traumático de miembros inferiores (T. Ruiz & A.L. Calle, 2013).

Tabla 5. Tratamiento Farmacológico de Diabetes Mellitus (T. Ruiz & A.L. Calle, 2013)

Clase	Mecanismo de acción	Compuesto	Contraindicaciones
Insulinosensibilizadores			
Biguanidas	↓ Producción basal de glucosa a nivel hepático ↑ Secreción de insulina	Metformina	Insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad renal crónica y hepática
Glitazonas	Actúa sobre los receptores activados por el proliferador de peroxisomas tipo gamma (PPAR-J) ↑ Captación de glucosa, principalmente a nivel muscular, así como en hígado y tejido adiposo	PTZ	DM1, embarazo o lactancia, así como en pacientes con historia de cardiopatía hipertensiva

Secretagogos de Insulina			
Sulfonilureas	↑ Secreción de insulina a partir del potencial de acción y receptores de SU	Glimepirida, Glibenclamida y Glicazida	Insuficiencia renal o hepática, DM1, embarazo o lactancia
Metiglinidas	↑ Secreción de insulina, por inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP de las células β pancreáticas	Repaglinida y Nateglinida	DM1, Insuficiencia hepática, cetoacidosis diabética, embarazo o lactancia
Inhibidores de la Reabsorción Renal de Glucosa			
Inhibidores del cotransportador sodio/glucosa tipo 2	↓ Reabsorción de glucosa del cotransportador de sodio/glucosa tipo 2 y preservar la masa de células β	Dapagliflozina y Canagliflozina	Insuficiencia renal moderada, infecciones urinarias y genitales recurrentes, embarazo o lactancia
Parentales			
Insulina	↑ Aprovechamiento de glucosa ↓ Producción de glucosa	Aspart, Glulisina y Lispro	Ninguna
Agonistas del receptor GLP-1	↑ Insulina ↓ Glucagón y retrasa el vaciamiento gástrico.	Exanatida y Liraglutina	Nefropatías
Agonista de amilina	↓ Glucagón	Pramlintida	Fármacos que disminuyen la motilidad del tubo digestivo

3.12 Estreptozotocina (STZ) en la Inducción Química de Diabetes.

La STZ, es un compuesto derivado de nitrosourea, aislado del hongo *Streptomyces achromogenes*, con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro con un peso molecular de 265.221 g/mol. La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis puede inducir diabetes en roedores, debido a su efecto citotóxico específico de las células β -pancreáticas. De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas (p. ej., 50 mg/kg en 5 días consecutivos), sin embargo, se induce una diabetes

insulinopénica en la que interviene el sistema inmune, tal como ocurre en la diabetes DMT1 humana. Este modelo ha sido ampliamente utilizado para estudiar los acontecimientos inmunológicos que conducen a la insulinitis y muerte de las células β -pancreáticas, sin embargo, aún a estas dosis, permanece cierto grado al fracaso en la inducción, ocasionando la muerte del reactivo biológico, en presencia de algún tipo de sobrecarga o simplemente por las complicaciones del padecimiento. Por otra parte, se ha utilizado el modelo de administración neonatal de STZ como modelo a inducción de DMT2, dando la oportunidad de regeneración a las células β -pancreáticas, y así provocar sólo una deficiencia en la producción de insulina, y no, un déficit total (Díaz & Balibrea, 2007).

3.12.2 Mecanismo de Acción de la Estreptozotocina (STZ).

La STZ causa toxicidad a las células debido al deterioro ocasionado en el ADN, aunado a otros mecanismos de acción involucrados. Uno de los mecanismos es la activación de la poli-ADP ribosilación. La STZ es similar a la glucosa en la medida en que es transportada a las células β -pancreáticas por la proteína transportadora de glucosa GLUT2, pero no es reconocida por los demás transportadores de glucosa. Por lo tanto, las células β que tienen niveles relativamente altos de GLUT2 explican el porqué de la toxicidad específica de STZ, hacia las células β -pancreáticas (Szkudelski, 2001).

La STZ es un gran potente agente que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucoquinasa, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA. La dosis de STZ varían de acuerdo con la especie y cepa animal, por ejemplo, los ratones requieren dosis mayormente elevadas de STZ para inducir DM, en comparación con otras especies animales. Mientras que a los ratones ICR se les puede inducir DM, con dosis comparativamente más bajas (90-150 mg / kg), los ratones C57BL / 6 necesitan aproximadamente 200 mg / kg dosis de STZ para su inducción (Tahara, et al. & Yang, et al., 2012; Matsuyama-Yokono, et al., 2008).

3.13 Nefropatía Diabética.

3.13.1 Anatomía, Fisiología e Histología de Riñón.

Los riñones son órganos alargados de arriba hacia abajo, aplanados de adelante hacia atrás y su borde cóncavo mira hacia adentro. En concreto se distinguen dos caras convexas, dos bordes, uno extremo convexo y otro interno escoltado en su parte media, que corresponde al hilio del órgano. Se encuentran situados, apoyados sobre la pared abdominal posterior, por detrás del peritoneo, uno a la derecha y otro a la izquierda de la columna vertebral. El riñón mide por término medio 12 cm de longitud, 6 cm de anchura y 3cm de espesor. Pesa aproximadamente 140 g en el hombre y 125 g en la mujer. Su color es de rojo-café con consistencia firme y su parénquima es muy resistente (*Rouvière & Delmas, 1988*).

Cada riñón contiene una región llamada hilio en la cara medial, por la que pasan la arteria y vena renales, los linfáticos, la inervación y el uréter, que transporta la orina final desde el riñón hasta la vejiga. Se encuentra rodeado por una cápsula fibrosa y tensa que protege sus estructuras internas. Al realizar un corte de arriba abajo de los riñones, se observan dos regiones principales; la corteza externa y las regiones internas de la médula. La irrigación renal sanguíneo normal es de alrededor del 22% del gasto cardíaco, o 1.100 ml/min, en la cual la arteria renal entra en el riñón a través del hilio y después se ramifica progresivamente hasta formar las arterias interlobulares, las arterias arciformes, las arterias interlobulillares (también denominadas arterias radiales) y las arteriolas aferentes, que acaban en los capilares glomerulares, donde se filtran grandes cantidades de líquido y solutos (excepto las proteínas plasmáticas) para comenzar la formación de la orina (Figura 7). Los riñones ejercen numerosas funciones homeostáticas, entre ellas son las siguientes (*Guyton & Hall, 2011*):

- Excreción de productos metabólicos de desecho y sustancias químicas extraña
- Regulación de los equilibrios hídrico y electrolítico; la osmolalidad del líquido corporal y de las concentraciones de electrolitos; la presión arterial y del equilibrio acido-básico
- Secreción, metabolismo y excreción de hormonas

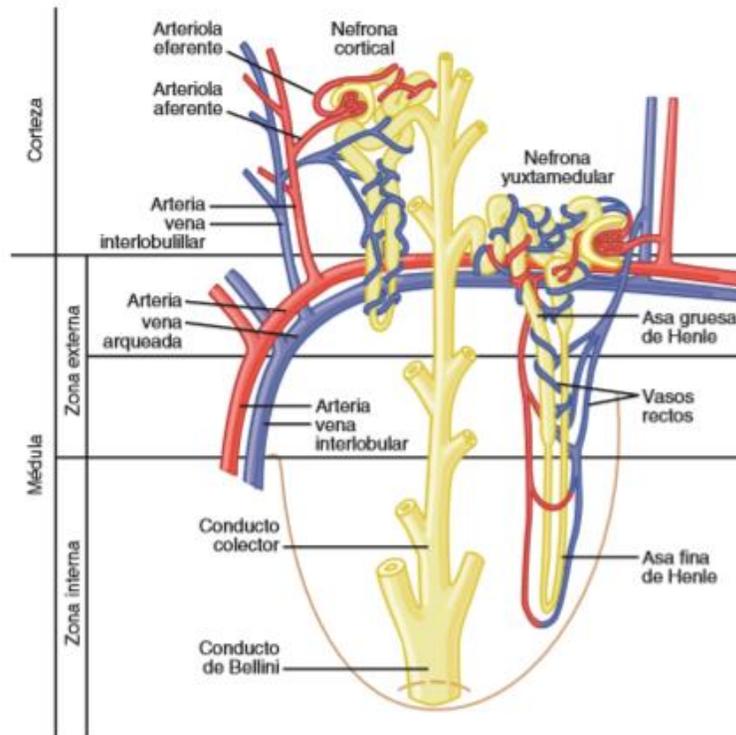


Figura 7. Esquema de las relaciones existentes entre los vasos sanguíneos y las estructuras tubulares y de las diferencias entre las nefronas corticales y yuxtamedulares (Guyton & Hall, 2011).

La unidad funcional del riñón es la nefrona. El ser humano contiene alrededor de 800.000 a 1.000.000 nefronas, que dependiendo de la profundidad a la que esté dentro de la masa renal se identifican aquellas que tienen glomérulos localizados en la corteza externa y se denominan nefronas corticales; presentan asas de Henle cortas que penetran sólo una distancia corta en la médula, y las nefronas yuxtamedulares; presentan glomérulos que se disponen en la profundidad de la corteza renal cerca de la médula. Cada nefrona contiene: 1) un penacho de capilares glomerulares llamado glomérulo, por el que se filtran grandes cantidades de líquido desde la sangre, y 2) un túbulo largo en el que el líquido filtrado se convierte en orina en su camino a la pelvis del riñón. El glomérulo contiene una red de capilares glomerulares (el endotelio capilar, la membrana basal y la capa de células epiteliales) que se ramifican y presentan una presión hidrostática alta de unos 60 mmHg, formando una estructura que actúa como microfiltro (tanto para agua como para otras sustancias), estos capilares glomerulares están revestidos de células epiteliales y todo el glomérulo está cubierto por la cápsula de Bowman (Figura 8). El túbulo está

conformado por varias porciones (el túbulo proximal, asa de Henle y túbulo distal), por la cual el líquido filtrado desde los capilares glomerulares circula hacia la cápsula de Bowman y después al túbulo proximal, que se encuentra en la corteza del riñón (*Guyton & Hall, 2011*).

La Membrana Basal Glomerular (MBG) restringe el movimiento de partículas, por lo general proteínas, mayores de 70.000 Da o 3,6 nm de radio como, por ejemplo, la albúmina o la hemoglobina. Sin embargo, a pesar de la capacidad de filtrado de restricción proteica, varios gramos de proteínas la atraviesan a diario. Estas proteínas se reabsorben por endocitosis en el túbulo contorneado proximal. La albuminuria o la hematuria indica una lesión física o funcional de la MBG, por ejemplo, la nefropatía diabética, la cantidad de sitios aniónicos, en especial en la lámina rara externa, está muy disminuida (*Ross, et al., 2012*).

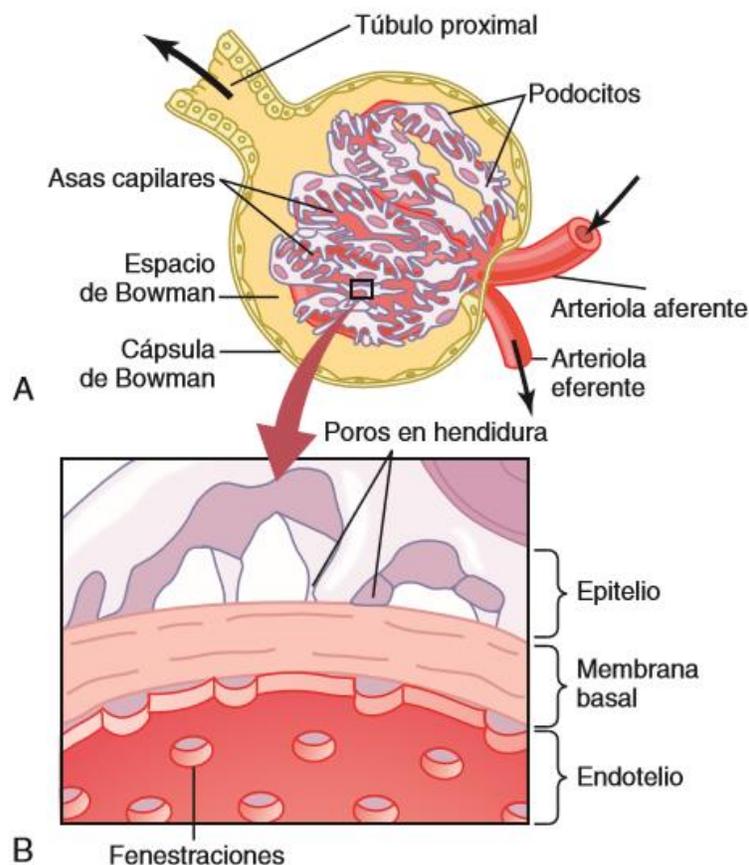


Figura 8. A Estructura básica de los capilares glomerulares. B Sección transversal de la membrana capilar glomerular y sus principales componentes: el endotelio capilar, la membrana basal y el epitelio (*Guyton & Hall, 2011*).

3.13.2 Etiología de Nefropatía Diabética.

La Nefropatía diabética (ND) es un síndrome clínico consecuente de los niveles glucémicos de la diabetes, caracterizada en presencia de proteinuria persistente ($> 0,5$ g/d) y ausencia de otros signos de enfermedad renal. Se encuentra acompañada de hipertensión arterial y deterioro progresivo de la función renal (Macía M., et al., 2001). El término ND señala lesiones renales originadas por lesión microangiopática o de los pequeños vasos, en la que se ve afectada la microcirculación renal desencadenando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular (Umanath k. & Lewis JB., 2018).

Actualmente la ND es la principal causa de insuficiencia renal crónica con un gran incremento progresivo del número de pacientes en diálisis y trasplante, por lo tanto, se ha convertido en un problema de salud pública con un gran impacto socioeconómico a nivel mundial. No obstante, la intervención terapéutica precoz y eficaz en las fases iniciales de diabetes mellitus establece la medida más adecuada para retrasar o evitar el desarrollo de la ND (Heras, et al., 2001).

El daño renal en la diabetes mellitus consiste en la alteración de múltiples factores que van desde los procesos de filtración glomerular, productos del metabolismo y la actividad enzimática. A pesar de que se reconoce a la hiperglucemia como la condición necesaria y elemento principal en el desarrollo de la ND, se desconoce los mecanismos por la cual conduzca íntimamente a la lesión renal, sin embargo, el nivel glucémico se involucra en los cambios funcionales y estructurales a nivel renal en la modificación hemodinámica corpuscular y la estimulación de procesos de proliferación e hipertrofias celulares (Fernández, et al., 2008).

El mecanismo de Hiperfiltración Glomerular hace referencia a la presencia de fenómenos de adaptación hemodinámica que incluyen la vasodilatación preglomerular, el aumento del flujo plasmático por nefrona y de la presión intracapilar glomerular, que explicarían la evolución inespecífica de la mayoría de las enfermedades renales hacia la Glomeruloesclerosis y la insuficiencia renal. Los factores mediadores en la hiperfiltración presentes en la diabetes mellitus son (Macía, et al., 2001):

- Hormonales: hiperglucemia, insulinopenia, aumento de los niveles de glucagón y hormona de crecimiento, aumento de las prostaglandinas renales, aumento del péptido natriurético atrial.

- Metabólicos: alteraciones en el funcionamiento de diversas vías metabólicas (poliol, calcio, quininas), presencia de productos de glicosilación avanzada, aumento de los niveles de ácidos orgánicos (aminoácidos, lactato, cetoácidos).
- Otros: ingesta proteica elevada, expansión del volumen extracelular, pérdida del mecanismo de retroalimentación túbulo intersticial, disminución de la respuesta de las arteriolas renales a hormonas presoras.

Por otra parte, la hemoglobina es una de las moléculas que sufre un proceso de glicosilación irreversible por el ambiente hiperglucémico, dando lugar al compuesto HbA1c en la unión de la glucosa y glóbulos rojos, resultado útil en el parámetro y seguimiento clínico para estimar el control glucémico reduciendo la posibilidad de llegar a padecer una Nefropatía (*Heras, et al., 2001*).

3.13.3 Fisiopatología de Nefropatía Diabética.

La presencia de hiperglucemia crónica determina los factores metabólicos en las complicaciones de un paciente diabético, de allí que el mal control glucémico es el requisito fundamental para que inicie la cascada de eventos tisulares que terminarán por lesionar los órganos susceptibles. Si bien, los niveles elevados de azúcar extracelular facilitan la modificación estructural de diversas moléculas tisulares formando los Productos Avanzados de Glicosilación (AGE's en la literatura americana), que afectan la estructura y función de la matriz extracelular en distintos tejidos. La mayoría de las células limita el ingreso del azúcar a sus compartimientos intracelulares por diversos mecanismos, sin embargo, hay 3 grupos celulares especialmente vulnerables a la aparición de hiperglucemia intracelular en presencia de hiperglucemia extracelular crónica, estas células son las endoteliales, mesangiales y las células de Schawn (*Umanath k. & Lewis JB., 2018*).

En cuanto a la presencia de hiperglucemia intracelular se produce un estímulo en la oxidación de la glucosa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, dando lugar a la presencia de más donadores de electrones (NADH y FADH₂), con aumento en su flujo a través de la cadena transportadora mitocondrial, generándose un alto potencial de membrana mitocondrial, lo cual inhibe el transporte de electrones en el complejo III, y aumento en la vida media de radicales libres

intermedios de la coenzima Q, los que dan lugar a un aumento de la conversión de oxígeno a radicales superóxido (figura 9) (Brownlee M, 2005).

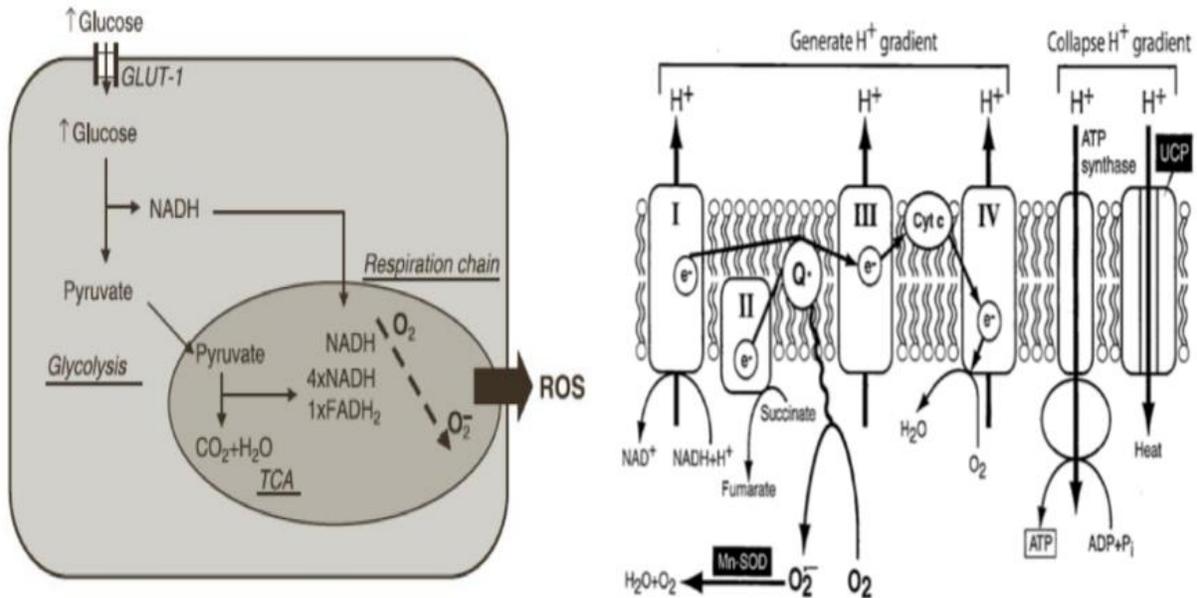


Figura 9. La hiperglucemia lleva a producción de superóxido por la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Brownlee M, 2005).

Los radicales superóxido en exceso inhiben la enzima Glicerualdehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), necesaria para la conversión de gliceraldehido a difosfogliceraldehido en la vía del metabolismo de la glucosa, produciendo un aumento de los precursores en la vía glucolítica los que posteriormente se encauzan a diferentes vías metabólicas relacionadas con lesión tisular:

1.- Incremento de flujo en la vía de los polioles y la actividad Aldosa-Reductasa (AR). La enzima AR presenta poca afinidad por la glucosa, sin embargo, en presencia de una hiperglucemia intracelular, la AR reducirá la glucosa en producción creciente de sorbitol, el cual posteriormente es oxidado a fructosa, proceso en el cual con lleva a la disminución del agente reductor NADPH favoreciendo el estrés oxidante e interfiriendo con la vía glucolítica normal y aumento de NADP, que afecta la capacidad celular de regenerar los niveles de Glutación, importante antioxidante intracelular. La presencia de Sorbitol el cual no difunde fácilmente a través de las membranas celulares inducirá un efecto osmótico con edema celular y aumentaría el daño producido por otros

mecanismos como la activación de la proteína kinasa C y la glicosilación proteica (*Hernández, et al., 2001*).

2.- Activación de la Proteína Kinasa C (PKC). La acumulación de NADH y G-3P promueve la producción de diacilgliceroles (ADG), un activador natural de la PKC. Esta enzima de la familia de las serinas-trioninas kinasa tienen la capacidad de fosforilar a las proteínas responsables de la transducción de señales intracelulares que regulan diversas funciones vasculares (la contractilidad, el flujo, la proliferación celular y la permeabilidad vascular). La disposición de la enzima kinasa activa la fosfolipasa A2, aumentando así la producción de prostaglandina PGE2 y de Tromboxano-A2 conllevando a la modificación drástica de la permeabilidad endotelial y la respuesta a la Angiotensina II en el músculo liso vascular, un cambio importante en el desarrollo del daño renal presente en la diabetes. La activación de la enzima tiene diversas alteraciones como, por ejemplo: la disminución de la actividad de Óxido Nítrico Sintasa (NOS) endotelial provocando vasoconstricción e hipoxia tisular y la inducción de la expresión del gen factor promotor de la permeabilidad (VEGF) en células del músculo liso promoviendo la angiogénesis y finalmente la inducción a la resistencia de insulina (*Macía, et al., 2001*).

3.- Sistema Renina Angiotensina (SRA). Es un determinante fundamental en los mecanismos que intervienen en el daño renal y vascular, ya que este sistema controla la presión arterial (PA) y el balance hidroelectrolítico a través de acciones coordinadas sobre el corazón, los vasos sanguíneos y los riñones. La Angiotensina II, por ejemplo: contribuye de manera directa a la progresión de la enfermedad renal, ya que actúa como una verdadera citoquina favoreciendo el crecimiento celular, la inflamación y la fibrosis. El principal efector del SRA, ejerce su efecto vasoconstrictor de manera predominante sobre las arteriolas eferentes del glomérulo, produciendo un aumento de la presión capilar glomerular y, como consecuencia, una mayor ultrafiltración de proteínas plasmáticas que contribuyen a la proteinuria, fenómeno importante en la aparición y progresión del daño renal (*Mora, et al., 2008*).

3.13.4 Determinación del Daño Renal Mediante la Observación Histológica.

Histopatológicamente, a nivel renal, todos estos cambios se traducen en depósitos de matriz extracelular (principalmente en el mesangio), además de engrosamiento de la membrana basal glomerular, cambios proliferativos y atrofia tubular que finalmente se traducen en fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis (vía final común de muchas enfermedades renales). Es por ello que es esencial evaluar el tejido renal utilizando estándares apropiados para la biopsia renal. Estas incluyen tinciones con hematoxilina-eosina, ácido peryódico-Schiff (PAS), tricrómo de Masson y ácido peryódico con metanamina de plata para microscopía óptica. Las biopsias deben contener al menos 10 glomérulos, excluyendo glomérulos incompletos a lo largo del borde de la biopsia. De acuerdo al sistema de clasificación propuesta por el Comité de Investigación de nefrología, las alteraciones glomerulares se clasifican de acuerdo al daño presentado en la biopsia (Tabla 6). Aunado a esto, el daño glomerular se puede identificar en la expansión mesangial por un aumento de material extracelular en el mesangio de tal manera que la anchura del área mesangial excede dos núcleos de células mesangiales en al menos dos lóbulos glomerulares, en la cual se puede observar en las lesiones morfológicas en ND (Figura 9) (*Thijs W. Cohen Tervaert, et al., 2010*).

Tabla 6. Clasificación Glomerular de ND (<i>Thijs W. Cohen Tervaert, et al., 2010</i>)		
Clase	Descripción	Criterios de Inclusión
I	Cambios leves o inespecíficos de microscopia de luz y engrosamiento de GBM probado por microscopia electrónica	La biopsia no cumple ninguno de los criterios mencionados a continuación para las clases II, III o IV. MBG >395 nm en mujeres y >430 nm en hombres
II a	Expansión mesangial leve	La biopsia no cumple con los criterios para la clase III o IV. Expansión mesangial leve en el 25% del mesangio observado
II b	Expansión mesangial severa	La biopsia no cumple con los criterios para la clase III o IV. Expansión mesangial severa en más del 25% del mesangio observado
III	Esclerosis nodular (lesión de Kimmelstiel– Wilson)	La biopsia no cumple con los criterios para la clase IV. Al menos una lesión convincente de Kimmelstiel– Wilson
IV	Glomeruloesclerosis diabética avanzada	Esclerosis glomerular global en más del 50% de glomérulos. Puede haber lesiones de clase I a III

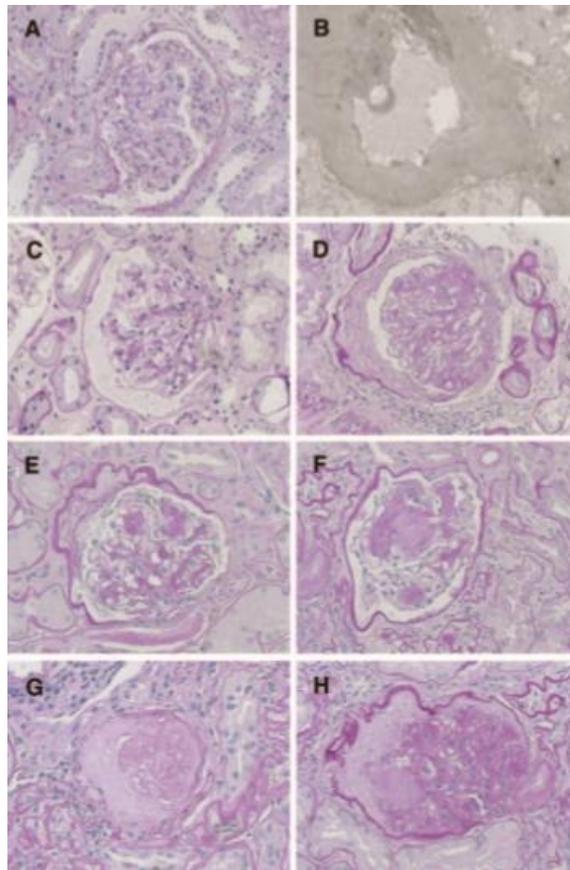


Figura 9. Representación de Lesiones Morfológicas en Nefropatía Diabética:

El glomérulo **A** muestra solo cambios isquémicos leves, con división de la cápsula de Bowman, sin alteración mesangial clara. En el glomérulo **B** el ancho medio de la GBM fue de 671 nm (media tomada sobre 55 mediciones aleatorias), por lo cual proporciona la evidencia para clasificar la biopsia con solo cambios leves microscópicos leves en clase I. En las muestras **C** y **D** los glomérulos se clasifican en la clase II con expansión mesangial leve y moderada, respectivamente. En el panel **C** la expansión mesangial no excede el área media de una luz capilar por lo cual cumple con los criterios de la clase IIa, mientras que en el panel **D** sí lo hace y se clasifica en la clase IIb. Las muestras **E** y **F** hay una lesión de Kimmelstiel-Wilson de clase III. La lesión en el panel **E** no es una lesión convincente de Kimmelstiel-Wilson, por lo tanto (sobre la base de los hallazgos en este glomérulo) el hallazgo es consistente con la clase IIb (*Thijs W. Cohen Tervaert, et al., 2010*).

3.14 Hepatopatía Diabética.

3.14.1 Anatomía, Fisiología e Histología de Hígado.

El hígado es una glándula voluminosa que secreta la bilis y transforma el azúcar alimenticio en glucógeno y finalmente en glucosa. Se encuentra situado en el espacio subfrénico derecho, limitado hacia arriba y hacia afuera por el diafragma, el colon transversal, su meso hacia abajo y la región celiaca hacia adentro. La glándula está dividida anatómicamente por surcos profundos en dos lóbulos grandes (derecho e izquierdo) y dos pequeños (lóbulo cuadrado y lóbulo caudado). Es un órgano de color rojo oscuro y tiene una consistencia bastante firme, sin embargo, es friable, frágil y se deja deprimir por los órganos vecinos. Presenta un peso aproximadamente de 1,500 g y mide por término medio 28 cm transversalmente, 16 cm en sentido anteroposterior, y 8cm de espesor en la zona más voluminosa de su lóbulo derecho. En conjunto, el hígado tiene una superficie lisa, con tres caras: una superior, que es convexa, lisa, regular y está dividida en dos lóbulos, uno derecho y otro izquierdo; una inferior, irregularmente plana, recorrida por tres surcos (dos anteroposterior y uno transversal) dividida esta cara en cuatro segmentos o lóbulos (lóbulo izquierdo, lóbulo derecho, lóbulo cuadrado y lóbulo de spigel; y otra posterior, que es vertical y presenta una cavidad transversal muy pronunciada, que se adapta al saliente formado por la columna vertebral. El hígado presenta dos vasos funcionales importantes, la vena porta y la arteria hepática, donde la sangre aportada por los mismos, después es conducida a la vena cava inferior (*Rouvière & Delmas, 1988*).

La unidad funcional básica del hígado es el lobulillo hepático cuya estructura es cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0,8 a 2 mm de diámetro. El ser humano contiene entre 50.000 y 100.000 lobulillos. El lobulillo hepático, se constituye alrededor de una vena central (o centrolobulillar) que desemboca en las venas hepáticas las cuales convergen en la vena cava como se mencionó anteriormente; la estructura lobulillar está compuesta, en esencia, de múltiples placas celulares hepáticas. Cada placa hepática suele componerse de dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los conductillos biliares; estos discurren por los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos. Las diferentes funciones metabólicas del hígado tienen una relación entre sí, y se manifiesta en forma los trastornos hepáticos, puesto que alteran numerosas funciones a la vez. Entre las funciones más importantes se encuentran (*Guyton & Hall, 2011*):

1) En el Metabolismo de los hidratos de carbono:

- Depósito de grandes cantidades de glucógeno
- Conversión de la galactosa y de la fructosa en glucosa
- Gluconeogenia
- Formación de muchos compuestos químicos a partir de los productos intermedios del metabolismo de los hidratos de carbono

2) En el Metabolismo de las grasas:

- Oxidación de los ácidos grasos para proveer energía destinada a otras funciones corporales
- Síntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y casi todas las lipoproteínas
- Síntesis de grasa a partir de las proteínas y de los hidratos de carbono

3) En el Metabolismo de las proteínas:

- Formación de urea para eliminar el amoníaco de los líquidos corporales
- Formación de proteínas del plasma
- Interconversión de los distintos aminoácidos y síntesis de otros compuestos a partir de los aminoácidos
- Desaminación de los aminoácidos

4) Otras funciones:

- El depósito de vitaminas y de hierro
- La síntesis de los factores de la coagulación

3.14.2 Patología de la Hepatopatía Diabética

El exceso de peso se encuentra relacionada con la diabetes mellitus (DM) tipo 2, en el aumento de incidencia, prevalencia y morbimortalidad en términos de asistencia médica y de gasto sanitario. Los pacientes que padecen DM se diagnostican con una hipertransaminasemia, presentando una prevalencia de hígado graso no alcohólico (HGNA) muy alta de 50%-90%. La tasa de mortalidad ajustada por enfermedad hepática es 2-3 veces mayor en pacientes con diabetes

en la población general, lo que demuestra la importancia del conocimiento y detección de las alteraciones hepáticas en este grupo de pacientes (*Ramírez, et al., 2004*).

3.14.3 Etiología de Hepatopatía Diabética

La resistencia a la insulina tiene un papel muy importante en el desarrollo y la evolución de la patología de Hígado Graso No Alcohólico HGNA, que a su vez evoluciona a cirrosis, la cual está relacionada proporcionalmente con DM tipo 2. La acumulación de lípidos en los hepatocitos es mediante el mecanismo de Lipólisis Periférica, que aumenta la oferta de ácidos grasos libres en sangre y posteriormente serán captados por los hepatocitos. El segundo mecanismo es la Hiperinsulinemia que promueve la síntesis de ácidos grasos, a través de la activación del glucolisis. Por otra parte, el exceso de insulina disminuye, además, los niveles de Apo B-100, molécula que facilita el transporte de los triglicéridos fuera del hepatocito. La acumulación de ácidos grasos intrahepáticos es una fuente de estrés oxidativo, así mismo en la mitocondria se producen reacciones de peroxidación lipídica, inducción de citosinas y otros procesos que provocan inflamación y daño hepático (*Ramírez, et al., 2004*).

3.14.4 Determinación del Daño Hepático Mediante la Observación Histológica

Análisis Histológico de Hígado (*Ross, et al., 2012*):

Entre los componentes estructurales más importante del hígado se encuentra el parénquima, que consiste en trabéculas de hepatocitos bien organizadas, por lo que en las lesiones hepáticas los daños sobre el tejido pueden ser observados por la ausencia de este parénquima, en forma de vesículas gigantes vacías que delimita la desaparición del parénquima. El estroma de tejido conjuntivo por su parte puede presentar acumulación de fibras de colágeno que conlleva a la formación de tejido fibroso y la pérdida de la funcionalidad del órgano que se continúa con la capsula de Glisson, así como también se encuentran los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y conductores biliares. Por otro lado, está la estructura de capilares sinusoidales, que son los vasos que hay entre las trabéculas hepatocíticas y los espacios sinusoidales, que están entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos.

En términos de la unidad funcional del hígado se pueden describir en lobulillos clásicos, lobulillos portal y el ácino hepático. El lobulillo clásico consiste en pilas de trabéculas hepatocíticas anastomosadas, de una célula de espesor, separadas por un sistema interconectado de sinusoides que irriga las células con una mezcla de sangre venosa (porta) y arterial. Cada lobulillo mide alrededor de 2,0 x 0,7 mm. Los espacios portales están conectados entre sí y en una persona sana están separados con muy poco tejido conjuntivo interlobulillar. Durante en análisis histológico es importante observar el tamaño y estructura del lobulillo clásico, ya que su cambio de tamaño puede estar relacionado con la alteración de su metabolismo como se observa en el hígado graso.

El lobulillo portal que es el conducto biliar interlobulillar de la tríada portal de lobulillo clásico, presenta bordes externos la cual se encuentran trazadas entre las tres venas centrolobulillares que secreta la bilis que drena en su conducto biliar axial. En el caso del daño hepático estas estructuras pueden presentar, por ejemplo: en las zonas del ácino hepático, que tienen forma romboidal y es la unidad funcional más pequeña del parénquima hepático, se describen 3 zonas; la zona 1 que pertenece a la periferia del lobulillo, siendo el más cerca al eje de menor irrigación provenientes de la vena porta y la arteria hepática. La zona 3 corresponde al centro del lobulillo cuyos hepatocitos rodean la vena centrolobulillar y la zona 2. Las divisiones de dichas zonas son importantes en la descripción y la interpretación de patrones de degeneración, regeneración y efectos tóxicos específicos del parénquima hepático en relación con el grado o calidad de la perfusión vascular de los hepatocitos.

En la circulación hepática se denominan vasos interlobulillares a los vasos sanguíneos que están en los espacios portales, que forman las tríadas portales más pequeñas que envían sangre hacia las sinusoides y fluye en forma centrípeta hacia la vena centrolobulillar que transcurre a lo largo del eje central del lobulillo y desemboca en una vena sublobulillar, que convergen para formar las venas hepáticas y desembocan en la vena cava inferior.

En el caso de la linfa del hígado esta se origina se origina en el espacio perisinusoidal. El plasma que persiste en el espacio perisinusoidal drena hacia el tejido conjuntivo periportal y el líquido se introduce en capilares linfáticos. La linfa circula en vasos, en el mismo sentido que la bilis, es decir, desde los hepatocitos primero hacia los espacios portales y luego hacia el hilio hepático.

Por su parte los hepatocitos son células poliédricas que miden entre 20 y 30 μm en cada dimensión. Constituye alrededor del 80 % de la población celular del hígado y su vida media es de alrededor de 5 meses. Además, tiene la capacidad de regeneración en la pérdida de parénquima hepático por procesos tóxicos, enfermedades o cirugía.

En el hígado hay una irrigación doble que tiene un componente venoso dado por la vena porta que conduce la sangre venosa de oxígeno la cual proviene del tubo digestivo y de órganos abdominales importantes como el páncreas y el bazo. La sangre de la porta que entra al hígado contiene sustancias nutritivas, materiales tóxicos, eritrocitos y productos de degradación absorbidas en el intestino. Si bien el hígado es el primer órgano en recibir sustratos metabólicos, pero también es el primero que está expuesto a los compuestos tóxicos que se han absorbido. Por otro lado, está conformado por un componente arterial dado por la arteria hepática, que es una rama del tronco celíaco, la cual lleva sangre oxigenada al hígado. Ambos vasos se introducen en el hígado a través del hilio o porta hepatis, el mismo sitio por el que salen las vías biliares y los vasos linfáticos.

Cabe destacar que el hígado posee una enorme capacidad de recuperación después de una pérdida importante de tejido hepático, bien por hepatectomía parcial o por una lesión hepática aguda, siempre y cuando dicha lesión no se complique con una infección vírica o con inflamación. El factor de crecimiento hepatocitario (HGF) es esencial para la división y el crecimiento de las células hepáticas, producido por las células mesenquimatosas del hígado y de otros tejidos. Existen otros factores de crecimiento, en particular el factor de crecimiento epidérmico, así como citocinas, del tipo factor de necrosis tumoral e interleucina-6, que estimulan la regeneración de los hepatocitos. Sin embargo, enfermedades hepáticas asociadas a fibrosis, inflamación o infecciones víricas alteran seriamente la función hepática en el proceso regenerativo del hígado (*Guyton & Hall, 2011*).

3.15 Las Plantas como Alternativa de Tratamiento en la Diabetes Mellitus.

Estudios etnobotánicas dentro de la medicina tradicional en México han reportado más de 269 especies de plantas usadas empíricamente para el control de la DM, principalmente de las familias Astereaceae y Fabaceae (Hernández-Galicia et al., 2002; Rojas-Alba, 2009). En el sureste del país las principales plantas en uso tradicional para el tratamiento de la diabetes se ilustran en la Tabla 7.

Tabla 7. Especies de Plantas empleadas Empíricamente para el Control de la Diabetes en la Medicina Tradicional (Villareal, et al., 2015)

Familia	Género	Nombre local	Parte usada	Preparación
Cactaceae	<i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck	Nopal	Fruto	Extracto
Commelinaceae	<i>Tradescantia spathacea</i> Sw.	Maguey morado	Hoja	Cataplasma
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.	Vicaria	Hoja	Infusion
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i> L.	Cundeamor	Fruto	Cataplasma
Sapotaceae	<i>Manilkara zapota</i> (L.) P. Royen.	Chicozapote	Corteza y Hoja	Cataplasma
Xanthorrhoeaceae	<i>Aloe vera</i> (L.) Burn. F.	Sábila	Hoja	Cataplasma
Urticaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol	Guarumo	Hoja	Infusión
Asteraceae.	<i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	Árnica	Hoja	Infusión
Crassulaceae.	<i>Kalanchoe flammula</i> Stapf	Belladona	Hoja	Infusión
Lauraceae	<i>Persea americana</i> Mill.	Aguacate	Hoja	Infusión
Malvaceae	<i>Pachira aquatica</i> Aubl.	Zapote de aguaa (Apompo)	Corteza y Hoja	Infusión y Cataplasma
Euphorbiaceae	<i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc. Vaugh.	Chaya	Hoja	Infusión
Fabaceae	<i>Mimosa pudica</i> L.	Dormilonaa	Hoja y fruto	Infusión y Cataplasma
Bignoniaceae	<i>Tabebuia rosea</i> (Bertol) DC.	Macuilis	Fruto	Cataplasma

3.16 Familia Cucurbitaceae y sus Principios Activos.

3.16.1 Descripción Botánica.

La familia Cucurbitaceae también llamada cucurbitácea, forma un grupo grande de plantas de aproximadamente 130 géneros y 800 especies. Se cultiva en regiones cálidas del mundo y hace que algunas de estas especies sean populares entre los cultivos alimenticios (calabazas, melones, pepinos, chayotes, sandías, etc.) y en el uso de la medicina tradicional para tratar numerosas enfermedades, por ejemplo, como antiinflamatorio, antiviral, trastornos urinarios, analgésicos, antiulcerosos, antidiabéticos y antioxidantes (*Jian, et al., 2015*).

Se caracteriza por ser plantas trepadoras, anuales, monoicas o dioicas; presenta tallos herbáceos y delgados de aspecto leñoso, generalmente ramificados, ocasionalmente rollizos; sus hojas son alternas, pecioladas, reniformes, triangulares y se caracterizan por la presencia de abundantes tricomas cónicos, rígidos y de base multicelular, zarcillos laterales con respecto al pecíolo con un variado número de ramas, algunas veces rudimentarios; Las flores masculinas son largas con un cáliz acampanado y los sépalos son lineales, presentan tres estambres con un color amarillo a naranja pálido. Las flores femeninas tienen pedúnculos robustos, de 3-5 cm de largo, ovarios multiloculares de forma ovoide a elíptico y los sépalos son foliáceos. El fruto es de tipo baya, pepo, el mesocarpo es carnoso, jugoso o algunas veces cartilaginoso a leñoso formando cámaras o celdas que contienen las semillas; La semilla es de color blanco grisáceo con forma elíptica y están provistas de un borde ancho (CONABIO).

3.16.2 Distribución Geográfica.

Su cultivo se ha distribuido a otros países teniendo su origen en Mesoamérica cultivada desde el norte de México hasta Argentina, así como la India, China, Ucrania y Egipto. Gracias a su variabilidad, en cuanto a tamaño y color del fruto (*Mukesh, et al., 2010*).

3.16.3 Nutrientes y Fitoquímica.

La familia de Cucurbitaceae se considera un grupo de plantas con mayor beneficio para la salud, debido a sus diversos componentes biológicamente activos, tales como: polisacáridos, ácido p-aminobenzoico, aceites fijos, esteroides, proteínas y péptidos, provenientes en sus diferentes órganos. Los frutos, son considerados una rica fuente de carotenoides y ácido γ -aminobutírico y en minerales (potasio, calcio, zinc, magnesio, fósforo y hierro), así como también diferentes vitaminas (C, A, E, B1, B2, B3 y B9 como folato). Las semillas, son apreciadas por su alto contenido en proteínas y grandes cantidades de aceites y aminoácidos esenciales (Komal, et al., 2016; Pérez, 2016).

3.17 Género *Cucurbita* y su Actividad Antidiabética.

Los órganos más utilizados en la medicina tradicional de este género son aquellos que presentan componentes activos hipoglucemiantes, los cuales han sido recuperados del fruto y semillas. Entre los componentes evaluados se encuentran los polisacáridos no pectinados que son biomoléculas formadas por la unión de gran cantidad de monosacáridos, de los cuales, algunos tetrasacáridos aislados y evaluados en ratones diabetizados mediante estreptozotocina, demostraron tener importantes efectos en los niveles de glucemia (Jiang Z. & Quizhen Du, 2011).

Las Proteínas hipoglucemiantes, funcionan reduciendo los niveles de glucosa en sangre a nivel intestinal, un péptido llamado serina proteasa, que es una enzima con actividad inhibitoria en la DPP-IV y la α -glucosidasa, el cual ha sido aislado de *C. ficifolia* y ha demostrado dicha actividad gracias a la realización de ensayos in vitro (Holman, et al., 2008).

Especies del género *Cucurbita* y su actividad antidiabética:

Cuadro 1. Actividad antidiabética de *Cucurbita máxima*

Estudio	Componente	Actividad	Modelo	Bibliografía
Semilla	Extracto		Ratas Wistar albinas diabetizadas con estreptozotocina	Sharma A., et al., 2013
Fruto	α y β carotenos, polisacáridos	Disminuye niveles de glucosa en sangre.	Clínicamente	Chen, et al., 1994

Hoja	Extracto		Ratas Wistar albinas diabetizadas con estreptozotocina	Saha P., et al., 2011
-------------	----------	--	--	-----------------------

Cuadro 2. Actividad antidiabética de *Cucurbita pepo*

Estudio	Componente	Actividad	Modelo	Bibliografía
Hoja	Extracto	Reduce los niveles de glucosa en sangre y protección al páncreas	Ratón BALB/c diabetizadas con Estreptozotocina	Díaz, et al., 2019
Semilla	α , β , δ , γ tocoferoles	Los tocoferoles del sitio activo de tres proteínas hipoglucemiantes, PTP1 β , PPAR- γ y DPP-1V, bajando los niveles lipídicos y de glucosa	Rata Wistar inducida con nonionic copolymer PZ-407	Bharti SK, Kumar A, Sharma NK, Prakash BO, Jaiswal SK, et al., 2013
	Polisacáridos unidos a proteínas	Reduce los niveles de glucosa en sangre Incrementa niveles de insulina. Mejora la tolerancia a la glucosa en estado post-pandrial, debido a la actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa.	Ratas y conejos diabetizados con alloxan. Estudios <i>In vitro</i> .	Quanhong, et al., 2005 Kwon, et al., 2007 Peng, 2002 Zhang, 2001
Fruto	triterpenoides de tipo multiflorano, carotenoides, diferentes tipos de ent-kaureno, diterpenos y cucurbitaglicósidos	Previene la hiperglucemia post-pandrial	Clínicamente en pacientes con DMT2	Torres-Zapata, 2012 Pérez-Gutiérrez, 2016

Cuadro 3. Actividad antidiabética de *Cucurbita moschata*

Estudio	Componente	Actividad	Modelo	Bibliografía
Fruto	Gliceroglicolípido y tetrasacáridos	Efecto antihyperglucemiante	Ratones diabetizados con Estreptozotocina	Jiang Z.& Quizhen Du, 2011

Cuadro 4. Actividad antidiabética de *Cucurbita facifolia*

Estudio	Componente	Actividad	Modelo	Bibliografía
Semilla y fruto	D-chiro.inositol	Incrementa la secreción de insulina. Aumenta la cantidad de células β pancreáticas. Sensibiliza la acción de insulina	Rata Wistar diabetizada con alloxan (destrucción de células β -pancreáticas)	Xia&Wang, 2007
Hoja	Extracto	Antihiper glucemiante y anti-obesidad	Ratas diabetizadas con estreptozotocina	Zhang, 2004

3.18 Especie *Cucurbita pepo* Linnaeus.

Es una planta perteneciente al grupo “*zucchini*”, mejor conocida como “calabacitas” o calabacín”, su origen se encuentra en América, concretamente en zonas propias de México donde se han encontrado rastros con una antigüedad superior a los 10.000 años a.c. y datan hallazgos de 4.000 años a.c. que apuntan a que pudo ser domesticada en México y Estados Unidos, teniendo a *Cucurbita fraterna* y *Cucurbita texana* como antepasados silvestres (Andrés, 2012).

Es una de las especies cultivadas más antiguas, que se conocen, con evidencia arqueológica mexicana, por lo tanto, fue ampliamente cultivada por los pueblos indígenas en todo México, Centroamérica y América del Norte antes de la llegada de los europeos. Su principal uso en México ha sido gastronómico; las frutas inmaduras se consumen como verdura y la fruta madura por su sabor dulce es utilizada para hacer confitería y otras con fines decorativos en la fiesta de Halloween. Las semillas, ricas en aceite, también se utilizan en la preparación de postres conocidos como palanquetas. Los brotes de las flores también son comestibles preparadas en platillos llamadas quesadillas. Por otra parte, estudios etnofarmacológicos muestran que *Cucurbita pepo* se usa en muchos países para tratar numerosas enfermedades, por ejemplo, como anti-inflamatorio, antiviral, trastornos urinarios, analgésicos, anti-ulcerosos, anti-diabéticos y anti-oxidantes. La

medicina tradicional, han usado diferentes partes de la planta, incluida la carne de los frutos y las semillas (Pérez, 2016).

3.18.1 Taxonomía.

Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM) Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO (Tabla 8).

Tabla 8. Taxonomía de *Cucurbita pepo*

Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Género	Cucurbita
Especie	<i>Cucurbita pepo</i> L., 1753

3.18.2 Característica Vegetal.

Cucurbita pepo linnaeus, es una planta herbácea de tipo rastrera y enredadera con un tallo cilíndrico, áspero al tacto debido a la superficie pelosa. Presenta grandes hojas palmeadas de color verde, alternas y el limbo en la parte haz es suave al tacto y el envés es muy áspera, con pelos cortos y fuertes. La flor es monoica, de color amarillo intenso y de forma acampanada, se disponen alrededor del tallo al que se unen a través de un largo pedúnculo. El calabacín es un fruto carnoso con forma variable, de color verde por lo general, pero cuando se encuentra maduro presenta un color naranja. La semilla es de color blanco grisáceo con forma elíptica y están provistas de un borde ancho (CONABIO).

3.18.3 Distribución Geográfica.

La calabaza es originaria de Mesoamérica, y es cultivada desde el norte de México hasta Argentina y Chile. Su propagación va desde Europa (Francia y Portugal), Asia (Indonesia y China), y el oeste de América (*Mukesh, et al., 2010*).

3.18.4 Usos Etnomédico en Diversas Regiones del Mundo.

Tabla 9. Usos Etnomédico de *Cucurbita pepo* en el Mundo

Ubicación (país-región)	Nombre local	Parte	Administración	Tratamiento	Referencia
Distrito Ghimbi, suroeste de Etiópia	Buqqe	Semilla	Oral	Gonorrea	Agyare, et al., 2018
México, América Central, el distrito caribeño de Ripollès	Calabaza	Planta completa	Oral y Dieta	Obesidad y Diabetes	Balcha, et al., 2014
Pirineos, Cataluña, Península Ibérica	Calabassa	Flor y fruto	Dérmico	Acné, dermatitis, fiebre, Infección y toxicidad	Castro, et al., 2015
Municipio de Nkonkobe, Eastern Cape, Sudáfrica	Imithwane	Hoja	Oral	Artritis y sangre	Ayodele, et al., 2016
WestBank, Palestina	Kare'a	Semilla	Oral	Cáncer de mama	Jarada, et al., 2016
Delanta, noroeste de Wello, norte de Etiopía	UNSP	Fruta y hoja	Oral y dérmico	Gastritis, dolor de estómago y contra la caspa	Meragiaw, et al., 2016
Sudeste de Nigeria	Okeugu	Hoja	Oral	Malaria	Odoh, et al., 2018
Mongolia	-----	Fruta	Infusiones	Resfriado	Yang BM, et al., 2000
Egipto	-----	Semilla	Dieta	Dolor de próstata e infecciones	Kessler OJ, 1998
Europa	-----	Semilla	Dieta	Tratamiento en enfermedades urinarias	Bombardelli, et al., 1997
Norte, centro y suroeste de América				Diurético, gastritis,	McGinley M, 2011

	Calabaza	Semilla y hojas	Infusiones y Dieta	quemaduras, fiebre, tratamiento de náuseas y enteritis	
China	-----	Semilla	Dieta	Antiparasitante	Zhong-hua-ben-ca, 1999

3.18.5 Nutrientes y Componentes Fitoquímicos.

La calabaza se considera un alimento de alto contenido de nutrientes, rica fuente natural de fitoesteroles, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, antioxidantes, carotenoides y tocoferoles, componentes que atribuyen a los beneficios para la salud (*Pérez, 2016*).

Los tocoferoles son compuestos de aceite vegetal y son antioxidantes naturales. El aceite de semillas de la calabaza contiene una mezcla de isómeros β y α -tocoferol en el rango de 29.92 a 53.60 mg / 100 g, lo que hace que 79% y 84% respectivamente del contenido total de tocoferol (*Stevenson DG, et al, 2007*).

Semillas

Contienen aceite con los principales componentes de ácido graso que son palmíticos (C 16: 0, 10.68%) palmitoleico (C 16: 1, 0.58%), esteárico (C 18: 0, 8.67%) Oleico (C 18: 1, 38.42). %) Linoleico (C 18: 2, 39.84%), Linolenic (C18: 3, 0.68%), Gadoleico (C20: 1, 1.14%), ácidos grasos saturados totales (19.35%) y ácidos grasos insaturados totales (80.65%). Se han encontrado grandes concentraciones de escualeno en un rango de 583.2 a 747 mg / 100 g. El escualeno es un triterpeno producido por humanos, animales y plantas, es un precursor de las hormonas esteroideas, el colesterol y las vitaminas D en su biosíntesis en el cuerpo humano. Además, el escualeno es un compuesto que tiene efectos positivos en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (*Matus Z, et al, 1993*).

Fruta

Se caracteriza por un bajo contenido de grasa (2,3%, la pulpa de calabaza no es una fuente rica de aceite), carbohidratos (66%), proteínas (3%) (*McGinley M, 2011*) y un alto contenido de carotenoides con valores de 171,9 a 461.9 μ g (*Adedayo, et al., 2013*). El análisis mineral presenta niveles altos, sin embargo, se encuentran en un rango aceptados por la FAO (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis Mineral de la Pulpa de Calabaza

Mineral	Cantidad por kg
Mn	0.5 mg / kg
Fe	1.37 mg / kg
Cu	3.9 mg / kg
Pb	0.29 mg / kg
P	11.38 mg / kg
Ni	0.5 mg / kg
Ca	179 mg / kg
Mg	190 mg / kg
Na	159 mg / kg
K	160 mg / kg

3.18.6 Actividad Biológica de Fruto, Semilla y Hoja.

- **Antihiper glucemiante**

El estudio de semillas de *C. pepo*, han demostrado que la actividad antihiper glucemiante se debe a una mezcla de tocoferoles (α , β , γ y δ) y en el aislamiento de polisacáridos unidos a proteínas, en modelos *in vivo* e *in vitro* (Bharti SK, et al., 2013; Zhang Y, et al., 2013; Quanhong, et al., 2005), presentando una eficacia en la actividad antidiabética a través de sus actividades antioxidantes y su efecto hipoglucemiante.

- **Antioxidante**

La actividad antioxidante del extracto metanólico de las semillas de *C. pepo*, fue evaluada en dos estudios, los cuales concluyeron, que la contribución antioxidante está en los compuestos *fenólicos* (Xanthopoulou, et al., 2009) y *polifenoles* (Nawirska-Olszanska, et al., 2013).

- **Antiinflamatorio**

Los esteroides 3 β -hidroxicolestona-7-en-24-uno y 23, 24-dihidrocurbitacina-D, aislados de las semillas de *C. pepo*, fueron evaluados en modelos *in vivo* inflamatorios, disminuyendo la

activación de macrófagos y la producción de interferón, revirtiendo el proceso inflamatorio (Kikuchi, et al., 2015).

- **Hepatoprotector**

El efecto hepatoprotector de las semillas de *C. pepo*, se estudió sobre el daño hepático de ratas Sprague-Dawley, inducido por acetoaminofenol. Se realizó la monitorización de la transaminasa sérica incluyendo Aspartato Aminotransferasa (AST) y Alanina Aminotransferasa (ALT), en la cual indicaron la capacidad de las semillas *C. pepo* para reducir varios parámetros asociados con la lesión hepática, reduciendo significativamente los niveles de la transaminasa sérica. Además, la proteína de semilla aislada tiene un efecto antioxidante, por el efecto quelante y propiedades de la anti-xantina oxidasa y la actividad de eliminación de radicales libres (Nkosi C et al., 2006).

- **Antiulcerativo**

El derivado de Cucurbitacina, se aisló a partir del extracto metanólico de las semillas de *C. pepo*, el cual mostró actividad anti-ulcerosa, debido a la capacidad del compuesto de proteger la mucosa gástrica (Gill, 2011).

- **Anticancerígeno / antitumorales**

Los efectos apoptóticos de las Cucurbitacinas, se deben a su capacidad de modificar las actividades transcripcionales de los genes, a través de factores nucleares, mitocondriales y de potencial de membrana, así como, su capacidad para activar o inhibir proteínas (Ríos, et al., 2012).

- **Antimicrobiano**

La evaluación de la actividad antimicrobiana realizada en dos estudios diferentes de las hojas y fruto de *C. pepo*, demostraron tener dicha actividad contra los patógenos *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* (Noumedem, et al., 2013).

IV.- JUSTIFICACIÓN

En México, el empleo de la herbolaria para aliviar diversos padecimientos y enfermedades, forma parte de la vida cotidiana de la población y las razones se asocian con el apego a las tradiciones, la firme creencia de que lo natural es sinónimo de inocuo, la falta de acceso a una atención médica oportuna, y el alto costo de los medicamentos alopáticos. Sin embargo, aún no existe información científica suficiente en las plantas medicinales utilizadas para tratar problemas de salud como la diabetes, que aqueja mayor media a la población de escasos recursos y/o de tipo rural por carecer de atención primaria de salud eficiente (OMS, 2017).

Por este motivo es necesario sustentar la eficacia, calidad, inocuidad, desarrollo sustentable, y composición química, entre otros aspectos farmacéuticos de especies ampliamente utilizadas como *Cucurbita pepo*. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el marco de su estrategia sobre medicina tradicional 2014 - 2023, ha realizado numerosos llamados a sus países miembros para que investiguen científicamente, de forma sistemática y multidisciplinaria, los principales recursos utilizados en las prácticas médicas tradicionales para así acceder a éstos de manera segura, asequible y efectiva; y con ello promover un servicio de salud integral, reglamentado y supervisado por los organismos gubernamentales correspondientes.

En el caso de las plantas se ha visualizado que poseen diversos principios activos con múltiples aplicaciones antidiabéticas que van desde la inhibición de alfa glucosidasas, acción mimética a la insulina y función estimulante de la secreción de insulina, sin embargo, estos componentes químicos suelen existir en bajas concentraciones y/o cambiar por efecto del ambiente o estado del desarrollo de la planta requiriendo la estandarización de preparados medicinales para su uso razonable. En este sentido, *Cucurbita pepo* es una de las plantas más estudiadas con alto potencial de accesibilidad al contar con un sistema de cultivo ampliamente conocido y sostenible por ser parte fundamental de la alimentación humana.

En el marco de la fitoterapia es posible encontrar por un lado que los preparados tradicionales de *Cucurbita pepo* presenten un efecto más importante que los productos aislados, por el efecto conjunto de los constituyentes presentes en la misma y, por otro lado, que a partir de una menor dosificación en estos componentes se pueda evitar la presencia de toxicidad o efectos secundarios. Estas afirmaciones representan, el paradigma de la fitoterapia y es necesario

demonstrarlo mediante la evaluación de diferentes concentraciones de los fitoconstituyentes. En este sentido, *Cucurbita pepo* ha demostrado poseer propiedades antioxidantes y antidiabéticas atribuidas a su contenido de tocoferoles y cucurbitacinas, por lo que es importante estudiar estas bondades en sus diferentes órganos.

Finalmente, el grave problema de la diabetes y sus complicaciones a nivel global, y en particular en México justifican la realización del presente trabajo de investigación, así como el actual problema de la necesidad de regularización y uso racional de los recursos herbolarios.

V.- HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus administrado por vía oral a dosis de 300 mg/kg y 600 mg/kg presentará actividad hipoglucemiante en ratones diabetizados junto a un efecto renoprotector.

VI.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar la actividad hipoglucemiante y capacidad renoprotectora del extracto hidroalcohólico de hojas *Cucurbita pepo* linnaeus en ratones diabetizados.

6.2 Objetivos Particulares

1.- Determinar la capacidad hipoglucemiante de *Cucurbita pepo* a partir de la utilización de cuatro grupos de ratones hiperglucémicos (tratados con 300 mg/kg y 600 mg/kg de extracto hidroetanólico de hojas de la planta, 500 µg/Kg de glibenclamida y 50 µL de solución salina utilizada como vehículo) y ratones normoglucémicos sin ningún tipo de tratamiento.

2.- Evaluar el efecto renoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus a dosis de 600 mg/kg, mediante la comparación histológica renal de los tratamientos aplicados en ratones hiperglucémicos y normoglucémicos descritos en el apartado 1.

3.- Establecer el porcentaje de protección del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus sobre riñones de ratones diabetizados a partir del conteo de glomérulos y lobulillos íntegros.

VII.- MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Material Vegetal.

7.1.1 Recolecta del Material Vegetal.

El material vegetal se recolectó en el Campo Experimental de Agropecuarias (Figura 10), perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) de acuerdo con los estándares establecidos por la FARMACOPEA y la OMS (1998), La muestra del espécimen (hoja, flor y fruto) se depositó en el herbario del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), para su identificación taxonómica.



Figura 10. Cultivo y colecta de *Cucurbita pepo* en el Campo Experimental de Agropecuarias, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

7.1.2 Secado del Material Vegetal.

La manipulación del material vegetal se llevó a cabo durante un periodo de maduración fresca de tal forma que no se deteriore, desechando algunas partes manchadas o enfermas de la planta. El lavado de las hojas se realizó con agua de grifo. Cabe destacar que al secar el material antes de la molienda, evita el riesgo de contaminación por hongos.

Las hojas de *Cucurbita pepo* fueron prensadas en papel periódico con medidas de 56 cm de alto x 32 cm de ancho durante 15 días, tratando de optimizar en la mayor medida posible las

condiciones de secado, ya que la humedad excesiva y la incidencia de sol directa, así como el polvo atmosférico podrían dañar el material, destruyendo sus propiedades medicinales (Figura 11).



Figura 11. Secado de las hojas de *Cucurbita pepo*

7.1.3 Molienda del Material Vegetal.

La trituración del material vegetal seco se realizó en una licuadora TAURUS® de cinco velocidades. Finalmente, el material molido se colocó en frascos previamente esterilizados y etiquetados para su conservación y almacenamiento (Figura 13).



Figura 13. Molienda del material vegetal *Cucurbita pepo*

7.2 Preparación del Extracto Hidroetanólico de *Cucurbita pepo*.

El extracto hidroetanólico (30% H₂O - 70% C₂H₆O) de las hojas de *C. pepo* se realizó en proporción 1-5 utilizando 1 g de peso seco del material vegetal por cada 5 ml de solución hidroalcohólica. Para la homogenización de la mezcla se aplicó un proceso de sonicación durante 20 minutos (X3), de la cual se obtuvo únicamente la solución hidroalcohólica a partir de su filtración en papel filtro Whatman® N°1 de poro chico. Para la obtención del extracto crudo de la solución etanólica se recuperó mediante el proceso de evaporación en la campana de extracción (Figura 13). Una vez seco el extracto crudo se calculó el rendimiento del mismo, dividiendo el peso final entre el peso seco inicial, sacando el porcentaje del rendimiento multiplicándolo por cien.

El porcentaje del rendimiento neto del extracto se calculó con la siguiente relación:

$$\% \text{ de Rendimiento del Extracto} = \frac{\text{Peso final del extracto}}{\text{Peso inicial del peso seco}}$$



Figura 13. Preparación del extracto hidroalcohólico

7.3 Ejecución de la NOM-062-ZOO-1999.

Para la manipulación de ratones machos de la cepa BALB/c de 9 semanas de vida, se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y se reservaron en condiciones de ciclos de luz-oscuridad de 12 h, manteniendo un control de alimento y agua, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999, que tiene como objetivo establecer y uniformar las especificaciones técnicas para el uso y manejo de animales de experimentación.

7.4 Evaluación del Efecto Hipoglucemiante en Ratones BALB/c.

Para el presente estudio se utilizaron IV grupos de ratones (6n) de 7 semanas de edad con un peso aproximado de 25 ± 30 g. Los diferentes tratamientos para cada grupo de ratones fueron los siguientes:

Grupo I. Fue considerado como Blanco y no recibió ningún tipo de tratamiento más que el vehículo utilizado para los diferentes tratamientos (Citrato de sodio 0.1 M, pH 4.5).

Grupo II. Control Negativo: Estreptozotoicina + Vehículo

El segundo grupo experimental fue inducido con 135 mg/kg de STZ, ya las 72 h se evaluaron los niveles de glucosa que confirmaron la enfermedad. Durante los primeros días se llevó a cabo el proceso de eutanasia, para el estudio inmediato de la histopatología de hígado y riñón.

Grupo III. Experimental: DM + CP

Este grupo previamente a la administración del extracto hidroetanólico de las hojas de *C. pepo*, los ratones fueron diabetizados, esperando su confirmación a las 72 h, posteriormente se tomaron los niveles de glucosa al inicio del tratamiento, a partir de aquí, se le administrarán 300 mg/kg y 600 mg/kg en referencia al peso de cada animal, dicha dosis fue tomada en referencia a que la máxima actividad hipoglucemiante de las partes aéreas de *Cucurbita máxima* osciló entre 200 mg/Kg a 400 mg/Kg (Saha, et al, 2011).

Grupo IV. Control Positivo: DM + GLI

El control positivo está conformado por un grupo de ratones previamente diabetizados, a los cuales se les administró un fármaco hipoglucemiante llamado glibenclamida, con una dosis ya reportada en ratas Wistar albinas diabetizadas con STZ, la cual es de 500 ug/Kg (Saha, et al, 2011).

7.5 Inducción Química de Diabetes Mellitus.

La Estreptozotocina es un compuesto químico soluble en agua, alcoholes inferiores (metanol, etanol, isopropanol y butanol) y cetonas. En múltiples ensayos en los cuales se utilizó la STZ como inductor químico a DM en diferentes especies animales, se reporta como medio de solubilidad un Buffer Citrato de Sodio con concentración de 1 M y pH de 4.5, la cual fue preparada en un matraz volumétrico en cantidades de 100 ml y calibrará el pH indicado en el potenciómetro para proceder a esterilizarlo en la autoclave. Es importante mencionar, que la preparación del buffer debe ser lo más cercano posible a la fecha de inducción, ya que este tipo de amortiguadores tienden a contaminarse fácilmente, para esto también se recomienda congelar el buffer un día antes de la inducción y disolver en frío la STZ.

La inducción con STZ se realizó por un método establecido en el grupo de trabajo de dosis duales. La confirmación de diabetes mellitus (250 mg/dL) se realizó mediante la medición de glucosa sanguínea a las 72 h y a los 7 días posteriores de la aplicación de las dosis duales.

7.6 Administración del Extracto de *Cucurbita pepo* Linnaeus por Vía Oral.

La administración del extracto a dosis de 300 mg/Kg y de 600 mg/Kg de peso corporal se llevó a cabo durante un lapso de 21 días sin interrupción y a una hora establecida de acuerdo con su ciclo circadiano, por lo que cada animal fue pesado diariamente previa la administración del extracto. Dichas dosis efectivas fueron consideradas, de acuerdo con términos farmacológicos y toxicológicos de la IUPAC (*Duffus, et al., 1993*), así como considerando previos reportes realizados en especies del género.

El cálculo de la dosis a administrar el extracto se realizó con la formula siguiente:

$$\text{Dosis en gramos a administrar de CP} = \frac{0.3 \text{ g}}{1000 \text{ g}} * \text{Peso corporal del animal (g)}$$

7.7 Determinación de los Niveles de Glucosa en Sangre.

Los niveles de glucosa de los diferentes grupos de ratones fueron monitoreados el día 0, 7, 14 y 21, mediante la utilización de un glucómetro previamente calibrado de la marca One Touch® Ultra™. La toma de muestra sanguínea se obtuvo a través de una punción en la cola previamente desinfectada sobre ratones en ayuno de 12 h.

7.8 Proceso Histológico de Hígados y Riñones de Ratones Hiperglucémicos y Normoglucémicos.

La selección de ratones se llevó a cabo al azar en cada grupo experimental. Para el proceso de estudio de los tejidos utilizamos la Técnica Histológica, que consiste en la obtención de cortes finos de los órganos hígado y riñón. Previamente a la extracción de los órganos fueron colocados en solución salina, y posteriormente fijados durante 12 h en solución de formol al 10% y deshidratados con alcohol etílico a concentraciones crecientes (70 al 100 %) de 6 a 24 horas. El tejido se aclaró con xilol, y se llevará a cabo la inclusión con parafina durante un periodo de 1 a 6 horas, enseguida se continuó con el desmontaje de parafina con etanol para hacer la Microtomía con cortes de aproximadamente 7-8 μ . Finalmente, el proceso de tinción del tejido fue mediante la técnica de hematoxilina-eosina, para su posterior observación microscópica.

1. Toma de Muestra

El ratón fue dormido en cloroformo y posteriormente se realizó un corte vertical empleando el bisturí o navajas sin hacer demasiada presión en el cuerpo solo cortando la parte más superficial de la piel para finalmente llevar a cabo la extracción de los órganos.

2. Deshidratación y Aclaración

La deshidratación consiste en extraer o remover el agua de los tejidos fijados en la cual se aplica una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor agente deshidratante. La deshidratación debe ser completa ya que los solventes no actuaran de forma adecuada y el bloque

de inclusión no alcanzara la dureza requerida. Posteriormente se continúa con la aclaración o diafanización, utilizando xilol. Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto lo cual es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina (Tabla 11).

Tabla 11. Tren de Deshidratación		
No. De frasco	Solución acuosa	Tiempo
1	Agua destilada	10 min
2	Alcohol 50 %	40 min
3	Alcohol 70 %	40 min
4	Alcohol 80 %	40 min
5	Alcohol 85 %	40 min
6	Alcohol 90 %	40 min
8	Alcohol 95 %	40 min
9	Alcohol 100 %	40 min
10	Xilol	40 min

3. Inclusión en Parafina

Una vez fijado el tejido proceso en secciones para teñirlas. Como regla general se procede al endurecimiento de la muestra para poder obtener dichas secciones. Para ello las muestras se colocaron en cassette histológico en parafina y se etiquetaron con el tejido correspondiente. La parafina es una sustancia de aspecto ceroso que está formada por mezclas de hidrocarburos saturados. A temperatura ambiente es sólida y su punto de fusión puede variar entre 40 °C y 70 °C.

4. Microtomía

Se utilizó el micrótopo HINOTEC- Modelo KD-2258. En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes. Los cortes de 7-8 μ de cada órgano fueron transversal y longitudinal.

5. Tinción (Hematoxilina - Eosina)

Para la observación en el microscopio los tejidos pasaron por el tren de tinción de Hematoxilina-Eosina, que consiste en la tinción de los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hematina; y el citoplasma junto con el material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado (Tabla 12).

Tabla 12. Tren de Tinción (Hematoxilina- Eosina)		
No. De franco	Solución acuosa	Tiempo
1	Xilol	5 min
2	Xilol	5 min
3	Alcohol 50 % – Xilol 50 %	30 s
4	Alcohol 100 %	30 s
5	Alcohol 96 %	30 s
6	Alcohol 96 %	30 s
7	Agua destilada	5 min
8	Hematoxilina	3 min
9	Agua destilada	Entrada por salida
10	Alcohol ácido	Entrada por salida
11	Agua destilada	Entrada por salida
12	Carbonato de litio	Entrada por salida
13	Agua destilada	Entrada por salida
14	Eosina	2 min
15	Alcohol 96 %	Entrada por salida
16	Alcohol 96 %	Entrada por salida
17	Alcohol 100 %	Entrada por salida
18	Alcohol 50 % – Xilol 50 %	Entrada por salida
19	Xilol	Entrada por salida
20	Xilol	Entrada por salida

6. Observación Microscópica de los Cortes de Tejido

La observación de los diferentes cortes de tejido renal de cada uno de los grupos de ratones del presente estudio se realizó utilizando un microscopio óptico a diferentes enfoques (40x y 100 x) y en diferentes campos.

7.9 Evaluación del Efecto Protector del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de *Cucurbita pepo* Linnaeus sobre Hígado y Riñón de Ratonés Hiperglucémicos y Normoglucémicos.

El estudio histológico renal de los diferentes grupos de ratones y tratamientos utilizados en este trabajo fue realizado mediante el conteo de glomérulos inalterados o íntegros, de acuerdo con las características histológicas descritas en la literatura sobre riñones sanos y observados en ratones sanos (control de este experimento).

Para determinación del daño renal se utilizó el conteo glomerular considerando tres niveles de daño: íntegros, medianamente íntegros y desintegrados. Los cortes para dicho análisis se llevarán a cabo utilizando 3 secciones renales como se ilustra en la Figura 14. Al mismo tiempo se incluirá la descripción de patologías como la inflamación de las células glomerulares y atrofia tubular, frecuentemente observadas en la diabetes mellitus e hipertensión (*Browder, 2011*).

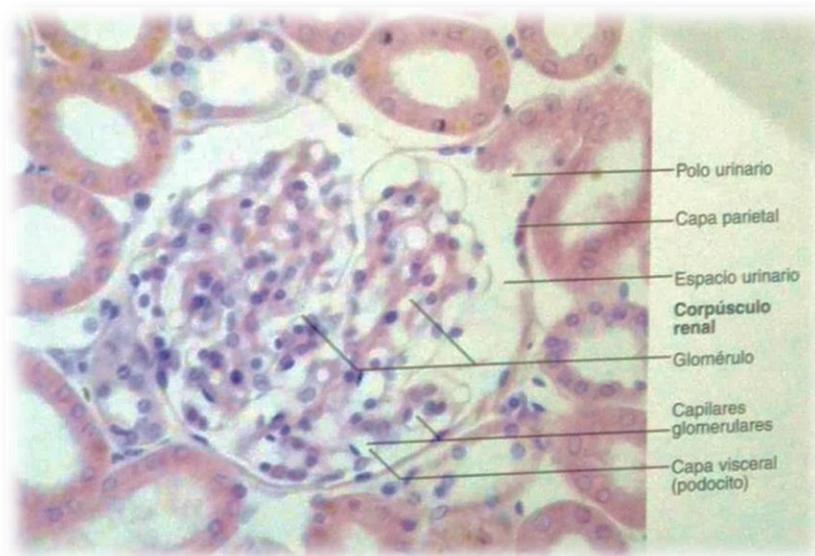


Figura 14. Fotomicrografía de un corpúsculo renal y su entorno cortical más cercano. Teñido con Hematoxilina-Eosina. X415.

Todos los parámetros contemplados para la presente evaluación histológica renal de ratones hiperglucémicos y normoglucémicos son ilustrados en la siguiente Tabla 11.

Tabla 11. Determinación del Efecto Protector del Extracto Hidroalcohólico de Hojas *Cucurbita pepo* Linnaeus

Grupo de ratón	Órgano a evaluar	Componentes a observar	Corte histológico	Sitio del tejido	Parámetros a evaluar
1.- Ratón sano 2.- STZ + Vehículo 3.- DM + CP 4.- DM + GLB	Riñón	Glomérulo, Túbulo proximal, y Túbulo de la arteriola y aferente	Transversal y Longitudinal en 3 secciones	Nefrona (Corteza)	Tamaño, Estructura y Forma de glomérulos Conteo de glomérulos íntegros e inalterados

Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos en el presente estudio histológico están expresados como medias \pm la desviación estándar y para la determinación de las posibles diferencias significativas se utilizarán diferentes pruebas estadísticas (ANOVA, DUNNETTE Y TUKEY).

VIII. RESULTADOS

8.1 Actividad Hipoglucemiante del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de *Cucurbita pepo* Linnaeus a Dosis de 300 mg/kg

Se evaluó la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* a 300 mg/dL en ratones diabetizados con estreptozotocina, observándose la disminución de los niveles de glucosa hasta el día 21 de su tratamiento (Gráfica 1). En este sentido, como se puede observar en la gráfica, el grupo tratado con 300 mg/Kg de la planta no mostró diferencias significativas con el grupo tratado con glibenclamida y el grupo sano (no diabetizado) de acuerdo con la prueba estadística de Tukey.

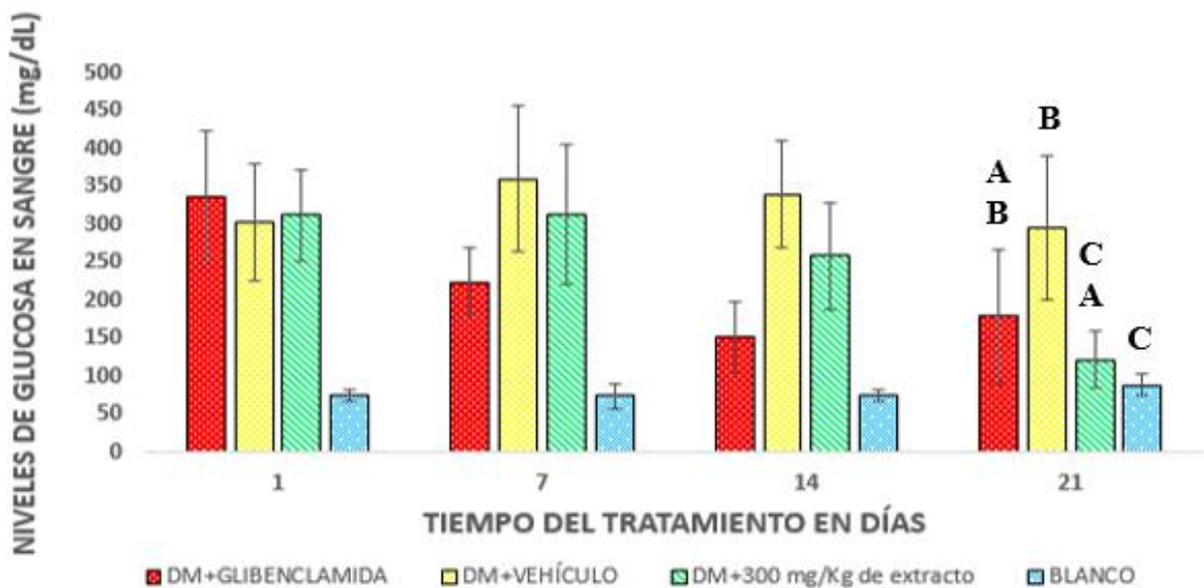
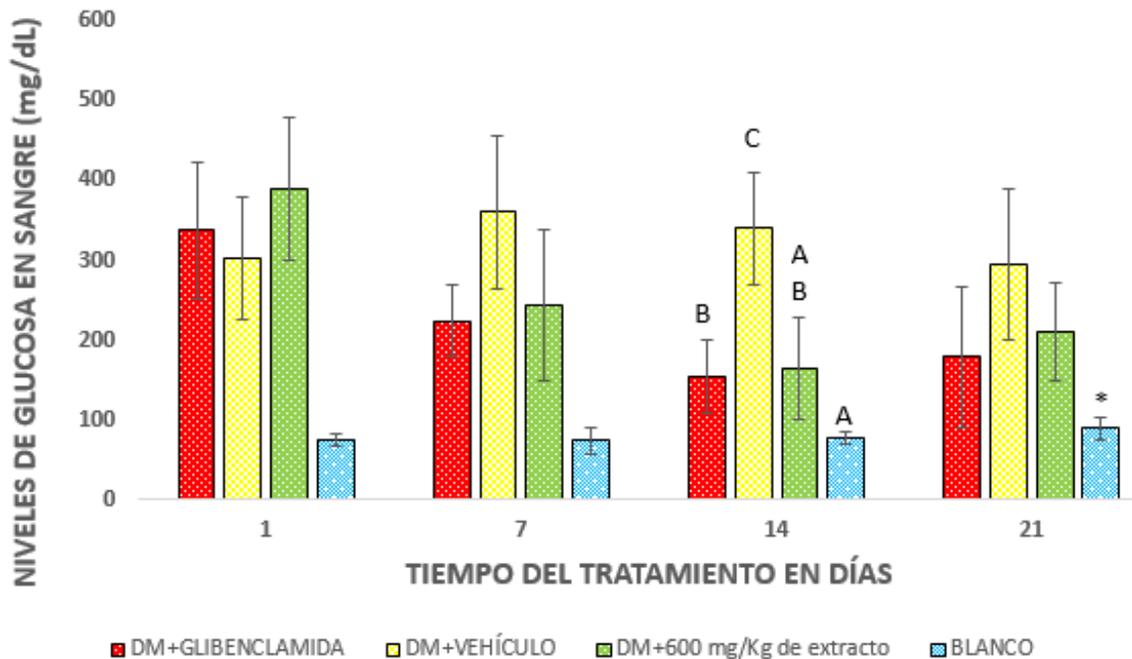


Figura 1. Gráfica de evaluación de la actividad hipoglucemiante a 300 mg/kg del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo*

8.2 Actividad Hipoglucemiante Preliminar del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de *Cucurbita pepo* Linnaeus a Dosis de 600 mg/kg

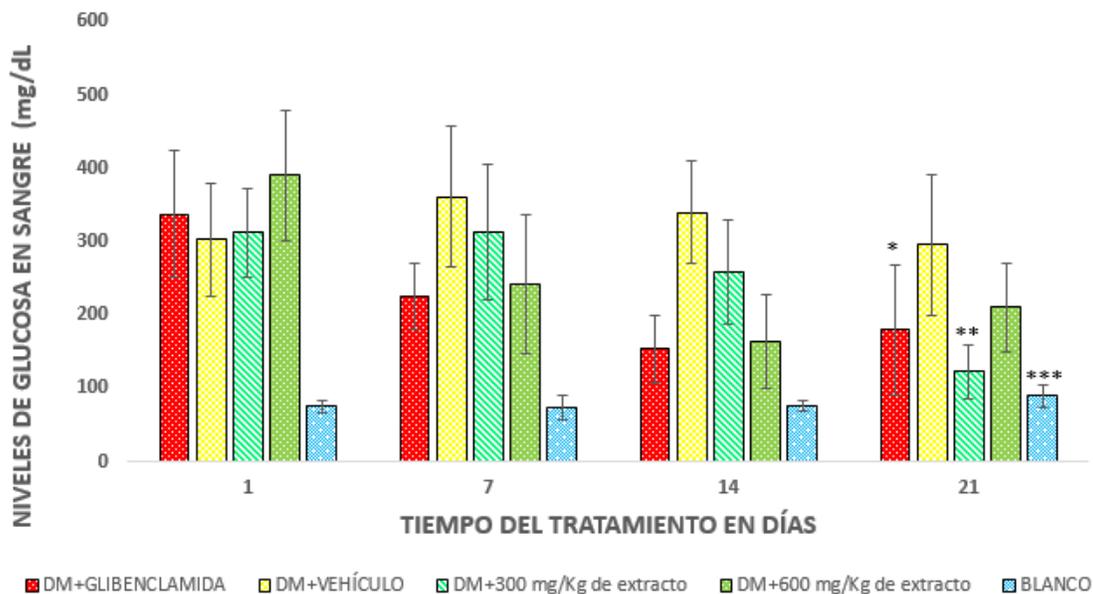
Una vez realizada la confirmación de la diabetes mellitus en los ratones BAL/c. La actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* a dosis de 600 mg/kg fue visualizada de manera significativa a partir del día 14 del ensayo y de acuerdo con el análisis estadístico Tukey One way ANOVA no presentó diferencias significativas con el fármaco glibenclamida ($p < 0.001$) (Grafica 2). Sin embargo, al día 21 del tratamiento esta actividad no fue visualizada de forma significativa. Esto probablemente debido al bajo número de individuos utilizados en el grupo, por lo que es considerado continuar con el estudio de la eficacia de esta dosis.



Grafica 2. Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* a dosis de 600 mg/kg.

8.3 Comparación de la Actividad Hipoglucemiante Preliminar del Extracto Hidroalcohólico de Hojas de *Cucurbita pepo* Linnaeus a Dosis de 300 y 600 mg/Kg

En la gráfica 3 se observa la comparación de acción hipoglucemiante de la dosis de 600 y 300 mg/Kg de extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* durante los 21 días de tratamiento. En este sentido, observamos que la dosis de 600 mg/Kg presenta mayor eficacia hipoglucemiante que la dosis de 300 mg/Kg, al estar presente desde el día 14 del tratamiento. Sin embargo, el efecto hipoglucemiante de la dosis de 300 mg/Kg también se hizo presente al día 21 del tratamiento, mostrando diferencia significativa con el grupo control (vehículo) de acuerdo con el análisis estadístico Tukey One way ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (Grafica 3).



Grafica 3. Comparación de la actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* en dosis de 300 y 600 mg/Kg.

8.4 Obtención de los Órganos de Hígado y Riñón de los Diferentes Grupos de Ratones Experimentales

Posterior a la eutanasia de los ratones de cada grupo experimental, a través de un corte ventral con la ayuda del bisturí y sin realizar demasiada presión sobre el cuerpo, fueron extraídos cuidadosamente el hígado y los riñones de los ratones para seguidamente ser lavados con solución salina y puestos en solución fijadora de formol al 10%. Como resultado se obtuvo el número de órganos ilustrados en la Tabla 12.

Grupo	Tratamiento	No. Hígado	No. Riñón
I	Sano control (-)	6	12
II	DM + Vehículo	4	8
III	DM + <i>C. pepo</i>	5	10
IV	DM + Glibenclamida	6	12

Posteriormente se llevó a cabo la técnica histológica en la cual los riñones fueron deshidratados con alcohol etílico a concentraciones crecientes (70 al 100 %) de 6 a 24 horas. Después el tejido se aclaró en xilol y se realizó la inclusión con parafina durante un periodo de 1 a 6 horas, seguidamente el desmontaje de parafina con etanol para hacer el corte en el micrótopo de 7 μ . Finalmente, el proceso de tinción del tejido con la técnica de hematoxilina-eosina, para su posterior observación microscópica

8.5 Evaluación Histológica Renal

Para el estudio histopatológico renal de los ratones de cada grupo experimental, se evaluó la estructura morfológica de los glomérulos por medio de la observación microscópica en tres zonas renales diferentes; anterior, media y posterior. Para ello se analizó la estructura de un corte histológico renal enfocado a 100x de un ratón sano, en la cual se identificaron las estructuras fundamentales en el proceso de filtrado glomerular en comparación de un glomérulo dañado (Figura 16).

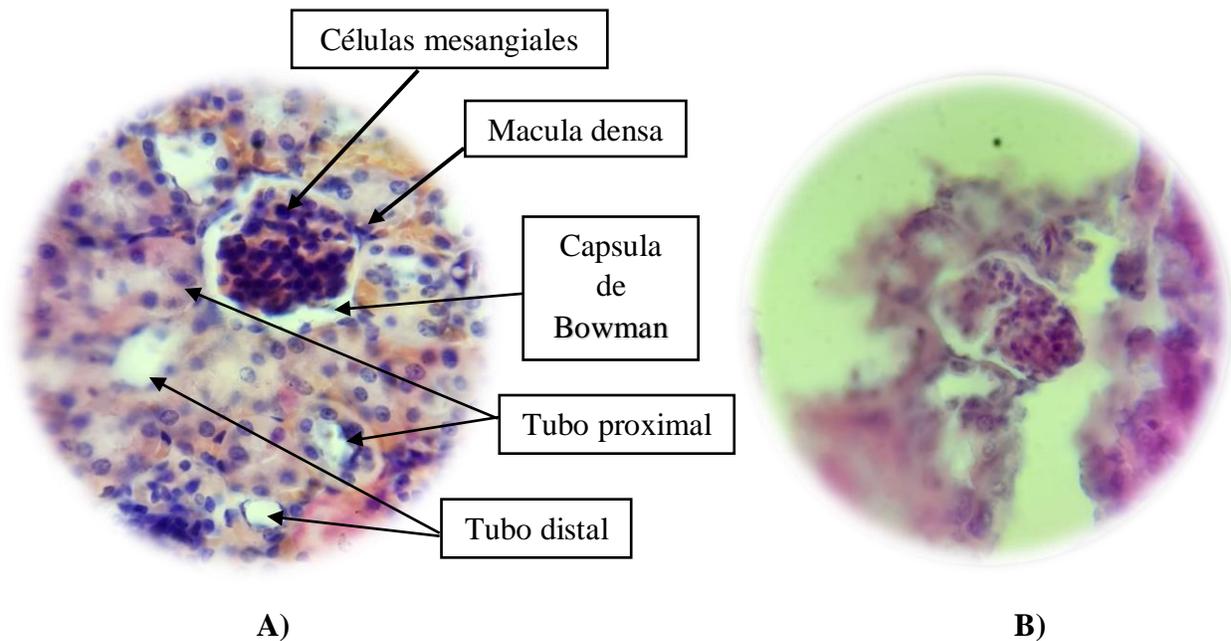


Figura 16. **A)** Corte histológico longitudinal de un riñón sano teñido con hematoxilina-eosina y enfocada al 100x, **B)** corte histológico longitudinal teñido con hematoxilina-eosina de un riñón dañado por la DM y enfocada al 100x.

La evaluación del conteo glomerular se realizó en la integridad morfológica del corpúsculo renal; capsula de Bowman y glomérulo, en tres zonas distintas del riñón para tener un enfoque completo, como se ilustra en la figura se puede observar una de las zonas de los diferentes grupos experimentales en el tratamiento de ratones diabéticos (Figura 17).

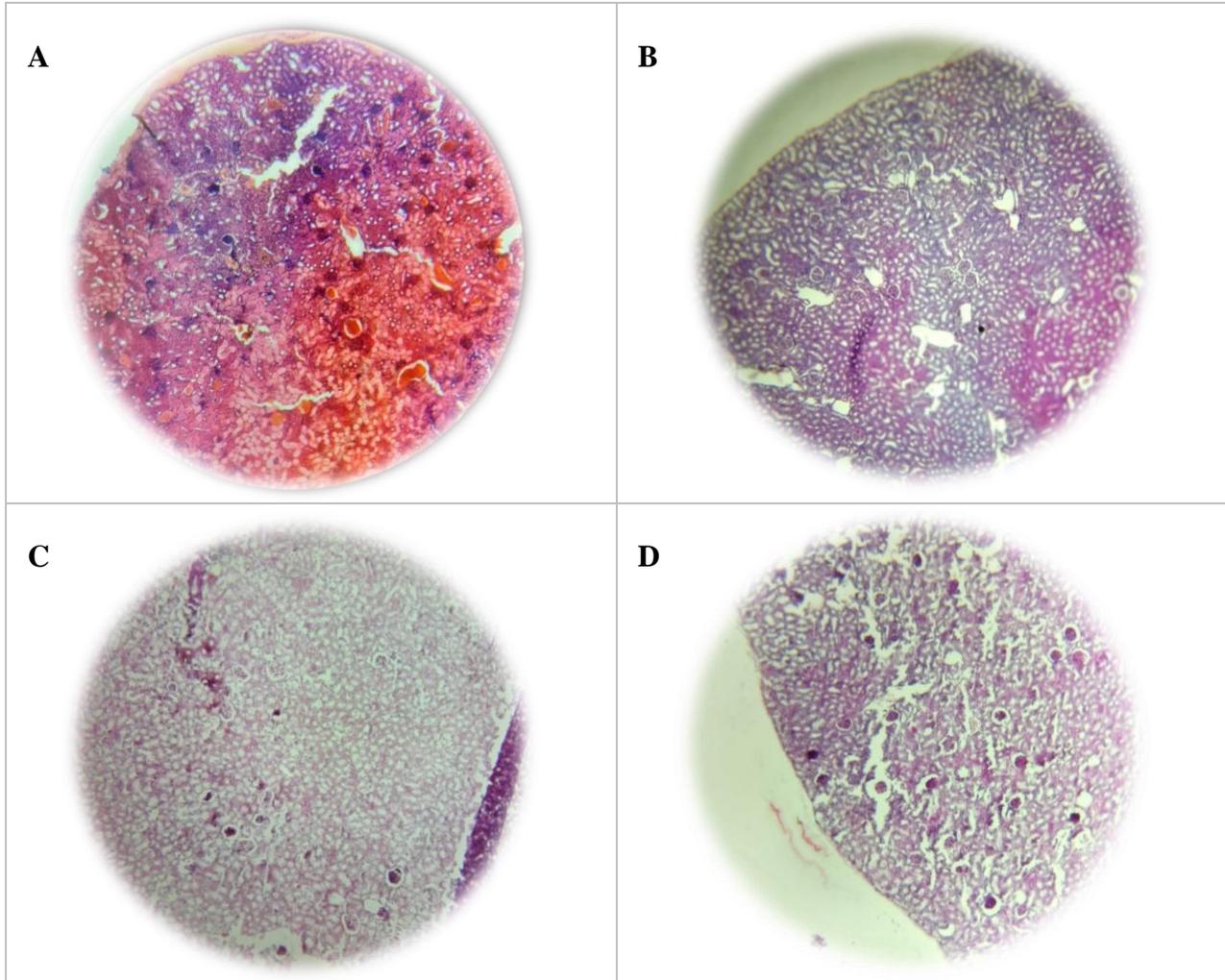
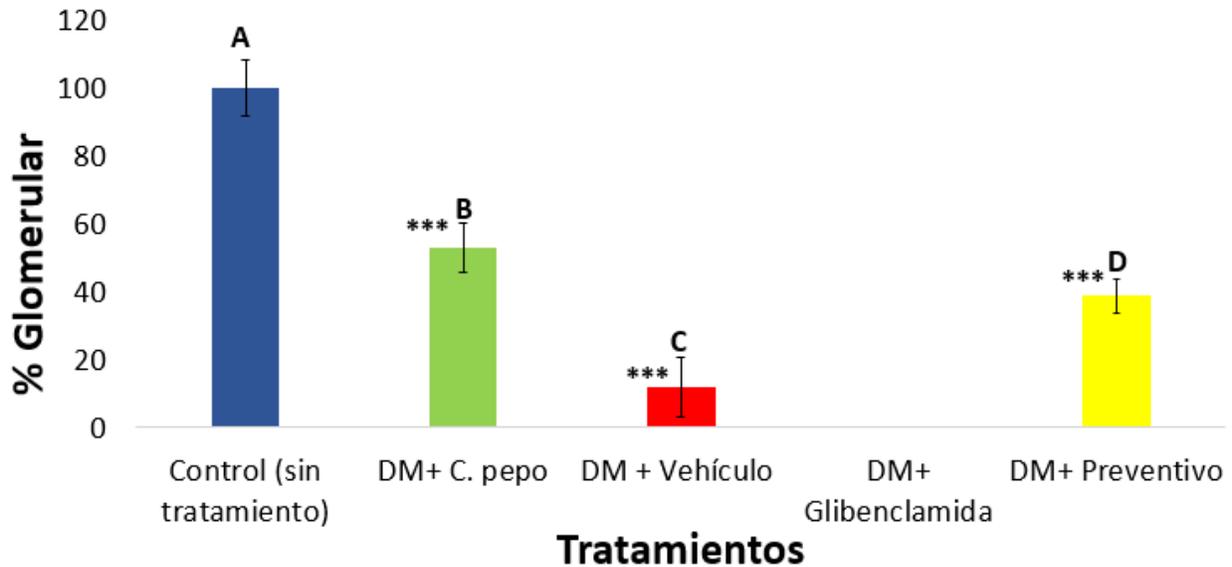


Figura 17. Corte histológico renal teñidos con Hematoxilina – Eosina, enfocada a 40x;

- A)** Ratón sano: 61 glomérulos íntegros
- B)** Ratón diabético + *Cucurbita pepo*: 29 glomérulos íntegros
- C)** Ratón diabético + vehículo: 14 glomérulos íntegros
- D)** Ratón con *Cucurbita pepo* + STZ: 22 glomérulos íntegros

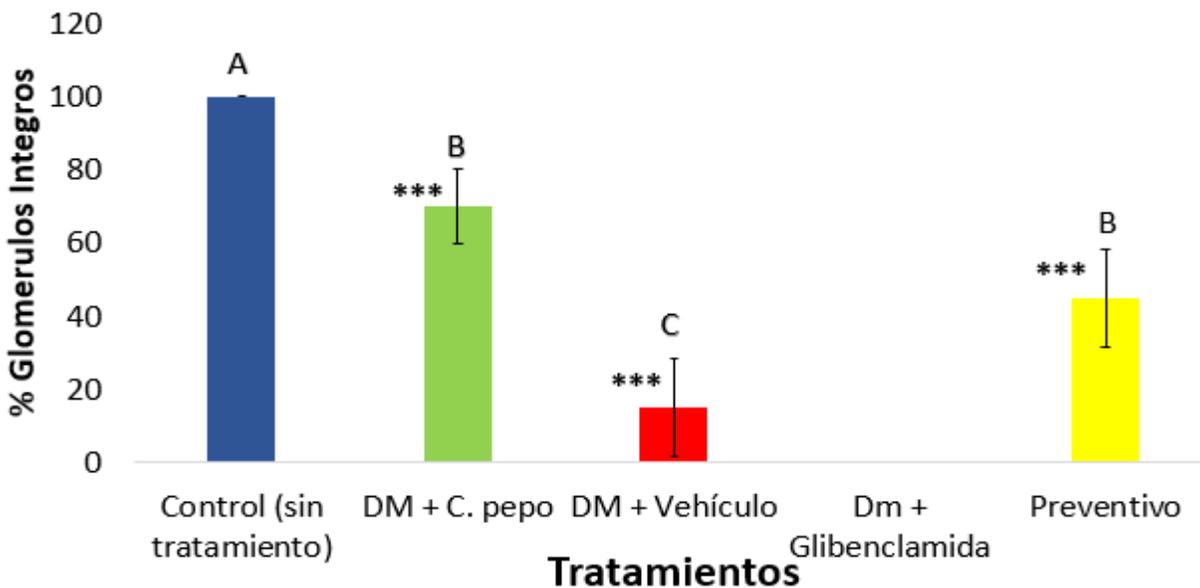
El grupo experimental de ratones diabéticos tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* a dosis de 300 mg/kg, muestra un porcentaje mayor del 50 % de glomérulos íntegros. Si bien, los ratones diabéticos tratados con vehículo presentan un daño glomerular superior al resto de los grupos experimentales, reafirmando que la planta presenta una capacidad renoprotectora. (Grafica 4).



Gráfica 4. Evaluación histológica renal de los diferentes grupos experimentales de la DM (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ Tukey Post-Hoc Test.)

8.6 Evaluación de Daño Renal

La actividad protectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *C. pepo* evaluada sobre los cortes histológicos de riñones en ratones diabéticos, queda demostrada en el presente estudio con la supervivencia del 70% de glomérulos íntegros observados en las secciones histológicas de este grupo experimental, en comparación a los diferentes grupos de tratamiento de la Dm (Grafica 5).



Gráfica 5. Evaluación del daño renal en los diferentes grupos experimentales de la DM (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$ Tukey Post-Hoc Test.)

De acuerdo al sistema de clasificación propuesta por el Comité de Investigación nefrología, las alteraciones glomerulares se clasifican de acuerdo al daño presentado en la biopsia como Clase I: Cambios leves o inespecíficos en la microscopía de luz y engrosamiento de la MBG demostrado por microscopía electrónica (ME), Clase IIa: Expansión mesangial leve en el 25% del mesangio observado, Clase IIb: Expansión mesangial severa en más del 25% del mesangio observado, Clase III: Esclerosis nodular (lesión de Kimmelstiel– Wilson) y Clase IV: Glomeruloesclerosis diabética avanzada. Esclerosis glomerular global en más del 50% de glomérulos. Puede haber lesiones de clase I a III. Mediante la observación microscópica en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, se realizó una evaluación de acuerdo a los criterios antes mencionado para lograr una clasificación en daño glomerular (Tabla 16).

Tabla 16. Clasificación de Daño Glomerular

Grupo experimental	Clase de daño glomerular
Ratón sano	Ninguno
DM + <i>C. pepo</i>	II a
DM + vehículo	IV
Preventivo	II b

IX. DISCUSIÓN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica degenerativa, caracterizada por la alteración de la secreción de insulina o pérdida de la sensibilidad a la misma, que favorece el desarrollo de una hiperglucemia crónica (*Islas, et al., 2013*). En este sentido es necesario incidir que un mal control glucémico juega un papel muy importante en el desarrollo de complicaciones microangiopáticas a nivel renal, ya que activa diferentes factores hemodinámicos que intervienen en el aumento de concentración de glucosa en el filtrado glomerular. La retroalimentación tubuloglomerular es un proceso fisiológico, que ayuda a la nefrona a regular el filtrado. Cuando se eleva esta actividad fisiológica en forma desproporcionada, aumenta el aporte de sodio a los segmentos distales, quienes son identificados por las células de la mácula densa, con posterior liberación local de adenosina. Por consiguiente, se genera vasoconstricción de la arteriola aferente y caída en la tasa de filtración glomerular. Por lo tanto, la mácula densa reacciona liberando localmente óxido nítrico y prostaglandina, vasodilatando la arteriola aferente, aumentando el flujo sanguíneo glomerular, hiperfiltración e hipertensión intracapilar, que garantizan el daño renal a nivel glomerular.

Si bien, a pesar del gran auge farmacológico de las últimas décadas, la diabetes sigue siendo la principal causa de insuficiencia renal crónica. La incidencia y prevalencia de esta enfermedad continúa en aumento como consecuencia de una alimentación poco saludable y del sedentarismo propio. Actualmente se utilizan fármacos insulinosensibilizadores como la metformina que, como principal mecanismo de acción se encuentra en reducir la producción basal de glucosa a nivel hepático, disminuyendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis. También aumenta la captación y la utilización tisular de glucosa en tejidos periféricos por lo que controlan la glucemia basal y preprandial. Por otro lado, están los secretagogos de insulina, como es el caso de la glibenclamida, dirigidas a controlar la glucemia postprandial, con la garantía de producir hipoglucemia que pueden ser prolongadas o recidivantes. Sin embargo, su vida larga y eficacia dependerá del grado de reserva secretagoga pancreática (*T. Ruiz y A.L. Calle, 2013*). Aunado a ello son fármacos contraindicados en pacientes que presentan problemas renales, es decir, no garantiza actividad

protectora, situación que genera un foco de alerta para el tratamiento adecuado de la Diabetes Mellitus.

De acuerdo con los resultados obtenidos a nivel histológico en la presente investigación, se demuestra que el tratamiento con *Cucurbita pepo* linnaeus puede ser más efectivo para la prevención de complicaciones renales generadas por la diabetes que la glibenclamida, un fármaco ampliamente utilizado para el control de la enfermedad. En el presente estudio preliminar de la dosis de 600 mg/kg de extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus muestra resultados hipoglucemiantes a partir del día 14 del tratamiento en comparación de la dosis de 300 mg/kg que se ve reflejada hasta el día 21. El control de nivel de glucosa favorece a controlar el aumento de glucosa sanguíneo y por ende el filtrado glomerular.

En cuanto a la capacidad renoprotectora del extracto se observaron un mayor número de glomérulos íntegros en los grupos diabetizados que recibieron el tratamiento con el preparado de la planta, lo que sugiere una mejor prevención de las complicaciones renales por diabetes mellitus. Esta disminución de daño renal ejercida por el extracto de la planta también fue superior al observado en el grupo con el fármaco glibenclamida. Por lo que es necesario y mejor no considerarlo un tratamiento único con glibenclamida y considerar uno combinado para una mejor acción antidiabética.

Cabe destacar, que el género *Cucurbita* pertenece a un grupo de plantas con una amplia investigación científica. En particular *Cucurbita pepo* presenta componentes recuperados de semillas como α , β , δ , γ tocoferoles que disminuyen los niveles lipídicos y de glucosa (Bharti SK, Kumar A, Sharma NK, Prakash BO, Jaiswal SK, et al., 2013), polisacáridos unidos a proteínas, que reducen los niveles de glucosa en sangre e incrementa niveles de insulina y mejora la tolerancia a la glucosa en estado post-pandrial, debido a la actividad inhibitoria de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa (Quanhong, et al., 2005; Kwon, et al., 2007; Peng, 2002 Zhang, 2001). Así mismo, cucurbitósidos, triterpenoides de tipo multiflorano, carotenoides, diterpenos, cucurbitaglicósidos, y diferentes tipos de ent-kaureno localizados en fruto con prevalencia de hiperglucemia post-pandrial (Torres-Zapata, 2012; Pérez-Gutiérrez, 2016), que son Componentes que se relacionan en la actividad hipoglucemiante y capacidad renoprotectora presentes en nuestra investigación del extracto de hojas. Por otra parte, se han encontrado componentes como β y α carotenos y polisacáridos en fruto de la especie *Cucurbita máxima*, con capacidad de disminuir los niveles de

glucosa en sangre (*Sharma A., et al., 2013*). Un péptido llamado serina proteasa es una enzima con actividad inhibitoria en la DPP-IV y la α -glucosidasa, el cual ha sido aislado de *Cucurbita ficifolia* con actividad reductora de niveles de glucosa en sangre a nivel intestinal (Holman, et al, 2008). Y finalmente tenemos a *Cucurbita moschata* con componentes gliceroglicolípido y tetrasacáridos encontrados en fruto con actividad antihiper glucemiante (*Jiang Z. & Quizhen Du, 2010*). De manera que el género *Cucurbita* presenta un historial comprometedor en el tratamiento de la diabetes.

X. CONCLUSIÓN

- En el presente estudio preliminar de la dosis de 600 mg/Kg de extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus administrada por vía oral presenta mayor eficacia hipoglucemiante que la dosis de 300 mg/Kg en ratones diabetizados con Estreptozotocina.
- En el presente estudio preliminar de la dosis de 600 mg/kg de extracto de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus administrada por vía oral presentó mayor efectividad antidiabética que el fármaco glibenclamida administrado a 500 µg/Kg.
- El estudio histológico renal permitió demostrar el efecto renoprotector del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus en ratones diabéticos a dosis de 600 mg/kg. Esto a través de un sistema cuantitativo de daño renal relacionado con el conteo de glomérulos íntegros y dañados visualizados por microscopía óptica.

XI. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio de la eficacia hipoglucemiante de la dosis de 600 mg/kg del extracto hidroalcohólico de hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus.
- Realizar estudios toxicológicos para demostrar la seguridad de su consumo.
- Estandarizar los preparados de las hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus para considerarlos con fines terapéuticos, mediante el control de su cultivo y la realización de pruebas fitoquímicas.
- Estudiar la composición química de las hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus.
- Profundizar en el mecanismo de renoprotección que ejercen los componentes presentes en las hojas de *Cucurbita pepo* linnaeus.
- La nefropatía diabética es una enfermedad cuya prevalencia aumenta proporcionalmente al tiempo de evolución de la diabetes mellitus y es originada por daño microangiopático o de los pequeños vasos, en la que se ve afectada la microcirculación renal desencadenando una serie de alteraciones funcionales y estructurales principalmente a nivel glomerular.

Referencias Bibliográficas

Barraza-Lloréns M, Guajardo-Barrón V, Picó J, García R, Hernández C, Mora F, Athié J, Crable E, Urtiz A (2015) Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013.

L. Díaz Nayaa y E. Delgado Álvarez (2016), Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes.

M. Macía Heras, M. Macía Jerez y F. Coronel (2001), Nefropatía diabética: fisiopatología y curso clínico.

Bharti SK, Kumar A, Shama NK, Prakash BO, Jaiswal SK (2013) Tocopherol from seeds of Cucurbita Pepo against diabetes: Validation by in vivo experiments supported by computation docking. J Formosan Med Assoc 112: 676-690.

Zhang Y, Chen P, Jin H, Zhu L (2013) Effects of polysaccharide from pumpkin on biochemical indicator and pancreatic tissue of the diabetic rabbits. Int J Biol Macromol 62: 574-581.

Quanhong L, Caili F, Yukui R, Guanghui H, Tongyi C (2005) Effects of protein bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. Food Research International 33: 233-245.

Kikuchi T, Ando H, Maekawa K, Arie H, Yamada T, (2015) Two new entkaurane- type diterpene glycosides from zucchini (*Cucurbita pepo* L.) seeds

Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE (2006) In Vitro antioxidative activity of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate and its in vivo effect on alanine transaminase and aspartate transaminase in acetaminophen- induced liver injury in low protein fed rats.

Guyton, A. C. y J. E., Hall. (2001). Tratado de fisiología médica. 10ª edición. MacGrawHill Interamericana. Madrid, España.

Julián Segura y Luis Miguel Ruilope (2013). Contribución del riñón en la homeostasis de la glucosa.

André Delmas y Henry Rouvière (1988). Anatomía Humana (Descriptiva, topográfica y funcional) Tomo 2, novena edición.

J. Antonio Díaz Rojo (2004), El término diabetes: aspectos históricos y lexicográficos.

F. de Álvaro Moreno, A. Aguilera Peralta y E. Valdés Chiong (2000), Nefropatía Diabética.

Diana P. Díaz Hernández, Luis Carlos burgos herrera (2002), ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?

Sergio A. Islas Andrade y María Cristina Revilla Monsalve (2013), Diabetes Mellitus. Actualizaciones.

Lorena López Anaya, José Antonio Lobo Guerrero y Wilson Yanes Peña (2005), Epidemiología de la diabetes mellitus

Federación Internacional de Diabetes 2017.

Mauricio Hernández Ávila, DSc, Juan Pablo Gutiérrez, PhD y Nancy Reynoso-Noverón, DSc (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia.

S. Aznar Rodríguez, A. Lomas Meneses, R.P. Quílez Toboso e I. Huguet Moreno (2012), Diabetes Mellitus.

L. Díaz Nayaa y E. Delgado Álvarez (2016), Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes.

M. Santiago Corchado (2000), Clasificación y Diagnostico de la Diabetes

L.F. Pallardo Sánchez (2004) Diabetes mellitus tipo 1. Historia natural y manifestaciones clínicas.

E. González Sarmientoa, M.C. Hinojosa Mena-Bernala y L. Inglada Galianab (2008), Diabetes mellitus tipo 1 y 2: etiopatogenia, formas de comienzo, manifestaciones clínicas, historia natural

L. Bougherara, S. Hanssens, D. Subtil, A.Vambergue, P. Deruelle (2018),Diabetes gestacional.

J.J. Alfaro Martínez, R.P. Quílez Tobosoa, A.B. Martínez Motosb y C. Gonzalvo Díaza (2012), Complicaciones hiperglucémicas agudas de la diabetes mellitus: cetoacidosis diabética y estado hiperosmolar hiperglucémico.

B. Pérez-Pevida, M. Llaverro, J. Gargallo y J. Escalada (2016). Complicaciones microvasculares de la diabetes.

José Javier Mediavilla Bravo (2000), Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento.

J. Arias-Díaz y J. Balibrea (2007) Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2.

T. Szkudelski, (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.

Michael H. Roos y Wojciech Pawlina. Sexta ed. (2012). Histología Texto y Atlas con Biología Celular y Molecular. Pag. 628-698.

Kausik Umanath and Julia B. Lewis. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. Am J Kidney Dis 2018. Article in press

M. Macía Heras, M. Macía Jerez y F. Coronel (2001), Nefropatía Diabética: Fisiopatología y Curso Clínico. NEFROLOGÍA. Vol. XXI. Suplemento 3. 2001

C. Mora-Fernández, M. Macía Heras, a. Martínez-castelao, J. I. górriz teruel, F. de alVaro Moreno, J. F. naVarro-gonzález (2008), Fisiopatología de la nefropatía diabética.

Villarreal-Ibarra, Edelia Claudina; Lagunes Espinoza, Luz del Carmen; López, Pedro Antonio; García-lópez, eustolia; Palma lópez, David Jesús; Ortiz-garcía, Carlos freddy; Oranday Cárdenas, María Azucena (2015), Evaluación Etnofarmacológica de plantas con propiedades hipoglucémicas usadas en la medicina tradicional del sureste de México.

Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM) Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO.

Mukesh Yadav, Shalini Jain, Radha Tomar, G. B. K. S. Prasada and Hariom Yadav (2020), Medicinal and biological potential of pumpkin: an updated review.

P. Saha, A. Bala, B. Kar, S. Naskar, UK Mazunder, PK Haldar and M. Gupta (2011) Antidiabetic Activity of *cucurbita maxima* Aerial Parts

Rosa Martha Perez Gutierre (2016) Review of Cucurbita pepo (Pumpkin) its Phytochemistry and Pharmacology.

Isabel M^a Andrés Ruiz Enero, (2012) Estudio preliminar para el desarrollo de una colección de mutantes en calabacín (*Cucurbita pepo*).

A. Tahara, E. Kurosaki, M. Yokono et al., “Antidiabetic effects of SGLT2-selective inhibitor.

Jorge Escobedo de la Peña (2013), *Epidemiología de la diabetes*.

Eduardo Valdés Ramos I y Niurka Bencosme Rodríguez (2010), The macrovascular complications and its relation to some clinical and biochemical variables in type 2 diabetes patients

Vasavada N, agarwal R. role of oxidative stress in diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005;12;146-154.

McGinley M (2011) *Cucurbita pepo*. The encyclopedia of earth. Edible medicinal and non-medicinal plants. Volume 2. Fruits. Springer Netherlands

Adedayo OR, farombi AG, Oyekanmi AM (2013) Proximate, Mineral and Anti-nutrient Composition of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L). *J Applied Chem* 4: 25-28

Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S (2009), Antioxidant and lipooxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Res Intern* 51:1831-1838

Nawirska-Olszanska A, Kita A, Biesiada A, Sokol Letowska A, Kucharska AZ (2013), Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed. *Food Chem* 139:155-161

Gill NS, Bali M (2011) Type triterpenoid from the seeds of *Cucurbita pepo*.

Noumedem JAK, Mihasan M, Lacmata ST, Stefan M, Kuate JR, et al. (2013) Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria.

Dubey A, Mishra N, Singh N (2010) Antimicrobial activity of some selected vegetables.

Ipragliflozin in streptozotocinnicotinamide-induced mildly diabetic mice.

A. Matsuyama-Yokono, A. Tahara, R. Nakano et al., “ASP8497 is a novel selective and competitive dipeptidyl peptidase-IV inhibitor with antihyperglycemic activity.

Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., y Zamilpa, A. (2012). Cribado in vitro de plantas medicinales utilizadas en México como antidiabéticos con glucosidasa y actividades inhibitoras de la lipasa. *Medicina complementaria y alternativa basada en la evidencia*, 2012, 1-6. Doi: 10.1155 / 2012/701261.

Cristóbal Gallego Muñoz¹, Francisco Javier Ferreira Alfaya, (2015): Plantas medicinales en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2.

Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, World Health Organ Tech Rep Ser. 1993;837:1-53.

Jian Z, Du Q (2011) Glucose-lowering activity of novel tetrasaccharide glyceroglycolipids from the fruits of cucurbita moschata. Bioorganic Med chem Lettrs 21:1001-1003.

Matus Z Molnar p, Szabo LG (1993) Main carotenoids in pressed seed (cucurbita semen) of oil pumpkim (cucurbita pepo convar. Pepo var. stryriaca) Acta phaim Hung 63:247-256

Stevenson DG, Eller FJ, Whang L, Jane JL Whang T, et al. (2007) oil and tocopherol content and composition of pumkim seed oil in 12 cultivars. J Agric Food Chem 55:4005-4013

Chen Z, Whang, Y.Jie, C.Huang and G. Zhag, 1994. Study on hypoglycemia and hypoglycemia and hypotension funatron of pumpkim powder on human. Jiangxi Chin. Med., 25:50-50

P. Saha A. Bala, S. Naskar, U.k Mazumder, P.K. Haldar and M. Gupta (2011) Antidiabetic Activity of Cucurbita Maxima Aerial Plarts 5:577-586

Zhang YJ (2004) Study on the hypoglycemic effect and extraction and analysis of pumpkin polysaccharide. J china Jiliang University 15:0238-0241.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Licenciatura en Biología
Programa Educativo de
Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 16 de mayo de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. JUAN DANIEL BARRERA OSORIO**, con el título del trabajo: **ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE Y CAPACIDAD RENOPROTECTORA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Cucurbita pepo* LINNAEUS EN RATONES DIABÉTIZADOS**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA

SECRETARIO: DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA

VOCAL: DR. NAHIM SALGADO MEDRANO

SUPLENTE: DR. JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR

SUPLENTE: DRA. MARÍA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

NAHIM SALGADO MEDRANO | Fecha:2023-05-16 20:54:08 | Firmante

sVnFDX9g53VlUhfYBndjEWOOKP89RvCqL5GwFhKDiBMGeowfD4ndQhsmIzNFuQa4xzeRbJkzmXbcX4Yg2onyzkQZ4OXX5NCQXIHPI4Tlq36pJldiEjp3mJfD7FISS9cVZ0AR0V3n0F9LX9Rnbl6R5ju9BY7ggHTc4q5fAtKxZ3wS4vsmkCWq4rj1OwURynjS1YcFuUjBQ+n970T3aBTMtQjON/Vgaz3N//x9l/P2sJXW6aspULeUHWbAPIGAXLx4XwYkpY7Eo/ uutEbPgvGutl4JlPeuHyB7vqD0a6KlmJst9GjpnkFcmrV/YuwA6l1bGubrdWJkdSVG/yJJPg==

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2023-05-17 09:41:28 | Firmante

UE2a4C63Zm/9hHRUjUY6jjKxcn6FwUCgQKY0SyC+1RTL62ePGh3DNeply+YcVK3nr+Wyrk6QKtJYz6t6LloFbtM9DAeoENdzYpvDTmiBAugMhk0fPn8XDW59R7uiS8dS/6r7UGymO+3zOmQ97oSC8/iLz6YcE4ywcZhxKaSnU2fq684GjrEM1VeEMVWbGBPUeV01XyaVzthi8ZsARfzFo1Iz9mx/Bn7gTgeZg5ovbPSMqZe57S42C1m4XTq6HbF71T/NEM3qyRfdSIH10DYLFZACGYwQBkOqCeYc8fa0HJY8u24nB6Vilmd1aJyiq4CimLLfO0TKvnrPRjKDo+GA==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2023-05-22 08:29:52 | Firmante

qFugSj/Eelzmk41/mqBx/6L9xWkX6ikuHNUDP+sLBKdcf5I4KAG3dagWFiTi0xF6tTETacu0E+NdO9+3YGABiV2TpeK3wm3h14xLD97wYR3PqIT/Pltd6VWxIMVuLWFg3VOUztxwFiXeWj9rC3po9FCKK2PbO/YYMwl+An/4+68LmT8cqH5Q+YGke3FwZBWSa1XDbRuJpd98bup20dhZ6EYe7kDG+2cgtM8g0w3inyvkiuwvUMl3pKMs3UJPIB9hZZzan938CGa503Zo82hvps/QFzhZArJFvk/llPe4jbxCOjgaURbiSZh0oDuk10kzVzT8ChapxarN/3pcCq1A==

MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2023-05-22 12:46:57 | Firmante

CiGeT1LDcv5TKhB6KbmWh2e4jIGDdwbIRnLAl+sdOITIDYrSPa8cCVM43p4Cuqw21BF8TmjBYtAQ4cbF4AP5pAKOGGz9vHfwVKr/+wRk/HgQq6TYQoB85cDFEQXR/3ij04MN6/v679tiKvalKpv2oNiBgdfVyrCHIN23tEzW1BASbL9MEB80MKNV2Y6P9Xo00zsgqj37CrheiM0+5Vi7AVKrzTQMLVkgI8EexpA17XFFhMloWnDjuFoWToC84Rbl1LyHfIHUdz0UGBeXSpjRRkMXEHbPfa3rFills0jW4r4mlQCRiDt2v0gFmOuvpSPH98jQRend80vfkfkh1jA==

JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR | Fecha:2023-05-23 11:25:24 | Firmante

EkCUsIcNRRNRmmtcY/fDv+ht5bUDCgFp2kbg7uRFwJgWQF6EL10MrIdcJATaVktfKR0guaHKw92LrweRb1WGM+DyGW10Td/pFtLUP+NyPaQ0Vhx9FRFIDqWecVaEY0jFqpW7+MJCOBpZF0bFpGkbt8oUleKmfARf6CTvkBz16XsDcopLHzg4/3UeMcbdB6xDmpntdeQuVUU7DQF5XnVwgMzndhj2fSAWI86aeNaa0Pa6+zfiWYpY9cER4H2PjY4tc6mY4z3GK1R4vT+8xQjsDdHQ3sHVerHf1x3CPxj7TWyWBIKRp+fzta02p/ndoHB5fL7dQhHcmAedvwqZTy2iQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3Tcbyn08h

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RkkKikDZvxHdIHVZfsUaB71DMPUavtSF

