

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SELECCIONES
MEJORADAS DE FLOR DE GRANADA (*Punica granatum* L.)
SOBRE LA HIPERGLUCEMIA Y DAÑO RENAL EN RATAS
DIABÉTICAS INDUCIDAS CON ESTREPTOZOTOCINA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ROGELIO IVAN SERVIN URIBE

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SELECCIONES MEJORADAS DE FLOR DE GRANADA (*Punica granatum* L.) SOBRE LA HIPERGLUCEMIA Y DAÑO RENAL EN RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS CON ESTREPTOZOTOCINA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ROGELIO IVAN SERVIN URIBE

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
DIRECTOR

Dr. CANDELARIO MONDRAGÓN JACOBO
CODIRECTOR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
II.1 Diabetes mellitus.	3
II.1.1 Definición.	3
II.1.2 Clasificación de la diabetes mellitus.	3
II.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1.	3
II.1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2.	4
II.2 Diabetes y estrés oxidativo.	4
II.3 Mediadores de la inflamación y su relación con las complicaciones de la diabetes.	7
II.3.1 Enfermedades cardiovasculares.	8
II.3.2 Nefropatía diabética.	9
II.4 Papel del receptor gamma activado del peroxisoma proliferador (PPAR- γ) y su relación con las complicaciones de la diabetes.	10
II.5 Tratamientos para la diabetes.	12
II.6 Flor de granada (<i>Punica granatum</i> L.) y su relación con la diabetes.	13
II.6.1 Generalidades.	13
II.6.2 Efecto antidiabético de la flor de granada.	14
III. HIPÓTESIS.	15
IV. OBJETIVOS.	16
IV.1 General.	16
IV.2 Específicos.	16
V. METODOLOGÍA.	17

V.1 Materiales.	17
V.1.1 Productos químicos y reactivos.	17
V.1.2 Material biológico.	17
V.2 Métodos.	18
V.2.1 Preparación del extracto acuoso.	18
V.2.2 Determinación de fenoles totales.	18
V.2.3 Determinación de antocianinas.	19
V.2.5 Ensayo de ABTS.	19
V.2.6 Estudios <i>in vivo</i> .	20
V.2.6.1 Inducción de la diabetes.	20
V.2.6.2 Grupos de estudio.	20
V.2.6.3 Determinación de glucosa.	21
V.2.7 Sacrificio y obtención de muestras.	21
V.2.8 Determinación del perfil de lípidos	21
V.2.9 Evaluación del daño renal en ratas diabéticas.	22
V.2.9.1 Determinación de microalbúmina y proteína en la orina.	23
V.2.9.2 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST).	23
V.2.9.3 Estimación de glutatión reducido (GSH) por medio de (DTNB).	24
V.2.9.4 Determinación de los niveles de la proteína PPAR- γ en riñón.	24
V.2.9.5 Determinación de la expresión del transcrito de VCAM-1 en riñón por RT-PCR.	25
V.2.9.5.1 Asilamiento de RNA.	25
V.2.9.5.2 Transcripción y amplificación.	25
V.2.10 Análisis estadístico.	26
VI RESULTADOS.	28
VII DISCUSIÓN.	36
VIII CONCLUSIÓN	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Secuencia de primers para la amplificación por PCR.	26
2	Contenido de fenoles y capacidad antioxidantes de los extractos acuosos de flores secas de granada (<i>Punica granada</i> L.).	29
3	Efecto de los extractos de flores de granada secas sobre el perfil de lípidos en ratas diabéticas.	31
4	Efecto de los extractos de flores secas de granada sobre la función renal en ratas diabéticas.	33
5	Efecto de los extractos de flores de granada seca sobre el contenido de GSH y la actividad de GST.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismos metabólicos relacionados con la hiperglucemia.	6
2	Modelos de activación del NF- κ B, mediado por el aumento de glucosa, estrés oxidativo, citocinas y ácidos grasos libres, para la transcripción de proteínas inflamatorias.	9
3	Representación esquemática de la activación del receptor y activado del peroxisoma proliferador y del receptor X retinoide, que actúan conjuntamente. En el núcleo de diverso tipos celulares regulan la transcripción de proteínas clave en el desarrollo del proceso de la aterosclerosis y de la resistencia a la insulina.	11
4	Activación de PPAR- γ y sus efectos biológicos.	12
5	Efecto de los extractos acuosos de flor de granada (1%) sobre los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas.	30
6	Efecto de los extractos acuosos de flor de granada sobre los niveles de la proteína PPAR- γ en riñón.	34
7	Efecto de los extractos acuosos de flor de granada sobre la expresión de VCAM-1 en riñón.	35

RESUMEN

La flor de granada (*Punica granatum* L) (FPG) ha sido usada como un antidiabético en la medicina tradicional, ya que previene y/o controla las complicaciones de esta enfermedad; este efecto se ha asociado con su potencial antioxidante. El objetivo de este estudio fue la cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos acuosos de selecciones mejoradas de flor de granada, así como la evaluación de sus efectos en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Los resultados muestran que el contenido de fenoles totales fue superior en la selecciones de color naranja (174.6-203.3 mg eq AG/g de flor seca) con respecto a las selecciones de color rojo y rojo oscuro (147.9-187.7 mg eq. AG/g de flor seca y 96.7-119.6 mg eq. AG/g de flor seca, respectivamente); este mismo comportamiento se observa en la capacidad antioxidante. Adicionalmente, el mayor contenido de antocianinas lo presentan las selecciones de color rojo oscuro y rojo. Los resultados sugieren que las selecciones de color naranja (39-7 y 34-1) y de color rojo (39-9 y 38-2) posiblemente poseen una actividad biológica, por lo que se evaluaron las selecciones 39-7 y 38-2 en un estudio *in vivo*. Estos estudios demostraron que un tratamiento diario de un extracto acuoso de flor de granada (1% W/V, selección 38-2c) en ratas diabéticas por tres semanas, disminuyen los niveles de glucosa en sangre, triglicéridos y LDL-C. Adicionalmente, la selección 38-2 protege contra daño renal, sin mostrar ninguna relación con la actividad de GST y nivel de GSH; sin embargo, esta selección disminuyó la expresión del transcrito de la proteína de adhesión VCAM-1. En conclusión, el extracto acuoso de FPG puede ser utilizado como un tratamiento alternativo para la protección contra daño renal en ratas diabéticas.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas epidemiológicos que caracteriza a nuestro país está dominado por enfermedades crónico-degenerativas. La diabetes mellitus es una de estas enfermedades crónicas que ha ido en aumento en los últimos años, convirtiéndose en una de las principales problemáticas para el sector salud, siendo una de las principales causas de mortalidad en el país. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud más del 80% de las muertes por diabetes mellitus se registran en países de ingresos bajos y medios, ocupando el octavo lugar entre las 10 principales causa de muerte por enfermedades no transmisibles.

La secretaria de salud, en México, reportó que en el 2005 la diabetes mellitus ocupaba un 16.3% en mujeres y un 11.3% en hombres como las principales causas de muerte. Las complicaciones más comunes que se presentan en la diabetes son la nefropatía diabética, insuficiencia cardiaca, enfermedad cerebrovascular e hipertensión. Estas complicaciones se han asociado con un aumento en el estrés oxidativo producido por hiperglucemia crónica, donde el estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de nefropatía diabética (ND), que es una de las principales causas de muerte por esta enfermedad.

Dado lo anterior, se han buscado terapias alternativas para la prevención y/o control de la diabetes mellitus, enfocándose en la búsqueda de tratamientos que puedan intervenir en diversos mecanismos, tales como: captadores de radicales libres, inductores de respuestas de defensa celular, inhibidores de factores de inflamación como: NF-kB; inductores de la expresión de PPAR- γ , entre otros.

En todo el mundo existe una gran diversidad de plantas con propiedades benéficas para la salud, tal como, la flor de granada (*Punica granatum* L.), la cual se ha recetado en la medicina ayurvédica para el tratamiento de la diabetes.

Punica granatum L. es un árbol distribuido originalmente en el Cercano Oriente; su cultivo se extendió desde la cuenca del Mediterráneo a México después de la colonización española y se adaptó bien a las regiones semiáridas del centro de México.

Estudios relacionados con extractos de flor de granada han mostrado una actividad hipoglucemiante, una reducción del colesterol total, triglicéridos y LDL-C en suero y un efecto antioxidante potente. Se ha demostrado que los compuestos fenólicos contenidos en la flor se asocian con un efecto antidiabético y antioxidante.

Actualmente en México, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) está implicado en la mejora genética de la granada con el objetivo de aumentar la calidad y la productividad de los huertos de granada en beneficio de los pequeños agricultores. Este estudio se centra en la investigación de los efectos de extractos acuosos de selecciones mejoradas de flor de granada sobre la hiperglucemia, hiperlipidemia, daño renal y su actividad antioxidante en ratas diabéticas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Diabetes mellitus.

II.1.1 Definición.

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa. Se caracteriza por la elevación de los niveles de glucosa en sangre (≥ 126 mg/dL o 7.0 mmol/L), defectos en la secreción o acción de la insulina y por alteraciones en el metabolismo de lípidos y de las proteínas. Estos trastornos, principalmente la hiperglucemia, se han asociado con una disfunción y eventualmente un deterioro de órganos, especialmente del riñón, nervios, ojos, corazón y vasos sanguíneos.

II.1.2 Clasificación de la diabetes mellitus.

De esta enfermedad se conocen dos tipos: diabetes tipo 1 o dependiente de insulina y diabetes tipo 2 o no insulino dependiente. Esta caracterización dada por la OMS, depende del cuadro clínico que muestre el paciente, haciendo posible su identificación, diferenciación, estado y tratamiento (The Expert Comite, 2003).

II.1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1.

Esta enfermedad se desarrolla por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas, ocasionando una progresiva deficiencia en la producción de insulina. Por ello se considera como una enfermedad autoinmune multifactorial que parte de una interacción compleja entre una susceptibilidad genética, poligénica e interactuando factores agresivos del medio ambiente (Zárate y Hernández, 2007). La sintomatología clásica (poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso y cetoacidosis) se presenta cuando la tasa de destrucción de las células β pancreáticas llega a un valor crítico, presentándose de manera más rápida en niños que en adultos, causando insulinopenia e hiperglucemia (The Expert Comite, 2003).

II.1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2.

En la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tejidos como el adiposo y el músculo-esquelético son incapaces de responder a la acción de la insulina (resistencia a la insulina), lo que conlleva a una disminución en la captación de glucosa. La resistencia a la insulina en el hígado ocasiona que la síntesis de glucógeno en paciente con DM2 sea 50% inferior que en sujetos sanos, provocando un estado hiperglucémico en ayunas por el incremento de la síntesis hepática de glucosa (Schinner y col., 2005).

Esta enfermedad está condicionada tanto por factores genéticos como ambientales. Entre los factores ambientales se tienen la edad, el tipo de alimentación y el estilo de vida. Su desarrollo se presenta en mayor medida en edad adulta y en pacientes con problemas de obesidad (The Expert Comite, 2003).

II.2 Diabetes y estrés oxidativo.

Baynes (1991) menciona que el desarrollo de las complicaciones diabéticas, debido al estrés oxidativo se da por un daño tisular que producen los radicales libres. De esta manera, se correlaciona el estrés oxidativo con el desarrollo de la nefropatía diabética (ND) y las complicaciones cardiovasculares (Giugliano y col., 1996).

Los niveles elevados de glucosa en sangre, que se van generando en el desarrollo de la diabetes y en la diabetes crónica, producen una serie de complicaciones asociadas a daños patológicos, como los son: daños microvasculares en la retina, nervios periféricos y glomérulos; siendo este último uno de los causales que más muertes provoca. Existen cuatro mecanismos que contribuyen al estrés oxidativo:

- Ruta de los polioles y actividad de la aldosa reductasa: La aldosa-reductasa (AR) es la primera enzima de la vía de los polioles, encargada de catalizar la reducción de una amplia variedad de compuestos carbonilo, incluyendo las hexosas. Esta enzima tiene muy baja afinidad por la glucosa, pero en presencia de hiperglucemia, se activa y aumenta la producción de sorbitol, lo que conlleva a una disminución de NADPH, iniciándose su propio proceso metabólico e interfiriendo con la vía glicolítica normal (Figura 1). El consumo de NADPH favorece el estrés oxidativo, al disminuir el cociente glutatión reducido/oxidado, lo cual acelera los procesos de glucosilación, así como aumenta la actividad de la vía de las pentosas, activando a su vez a la PKC (Chung y col., 2003).
- Incremento en el flujo de metabolitos a través de la vía de la hexosamina (fructosa-6-fosfato): La acumulación de fructosa puede contribuir en la activación de la vía de las hexosaminas, debido a que la formación de la glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato, la cual se ve incrementada. La activación de esta vía ha sido asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina (McClain y Crook, 1996), lo que puede estar mediado por la estimulación en la expresión de genes como el TNF α y β (Kolm y col., 1998).
- Activación de la proteína kinasa C: La PKC es la responsable de la fosforilación de proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares, cuya consecuencia es la regulación de funciones vasculares mediante la activación de factores de transcripción, lo cual produce la expresión de genes, principalmente de algunas citocinas pro-inflamatorias (Brownlee, 2001).
- Generación de productos de glicosilación avanzada (AGEs): La glicosilación avanzada es el proceso no enzimático por el cual se da la unión de azúcares

reductores como la glucosa, a diferentes moléculas como proteínas. Se han descrito receptores para estas moléculas (RAGE) que se expresan en diferentes regiones del tejido renal. La unión a estos receptores determina la activación de diversas vías de señalización intracelular, con la subsiguiente generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), liberación de citocinas inflamatorias y la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1; elementos relacionados con procesos de inflamación y daño vascular (Huebschmann y col., 2006; Tan y col., 2007).

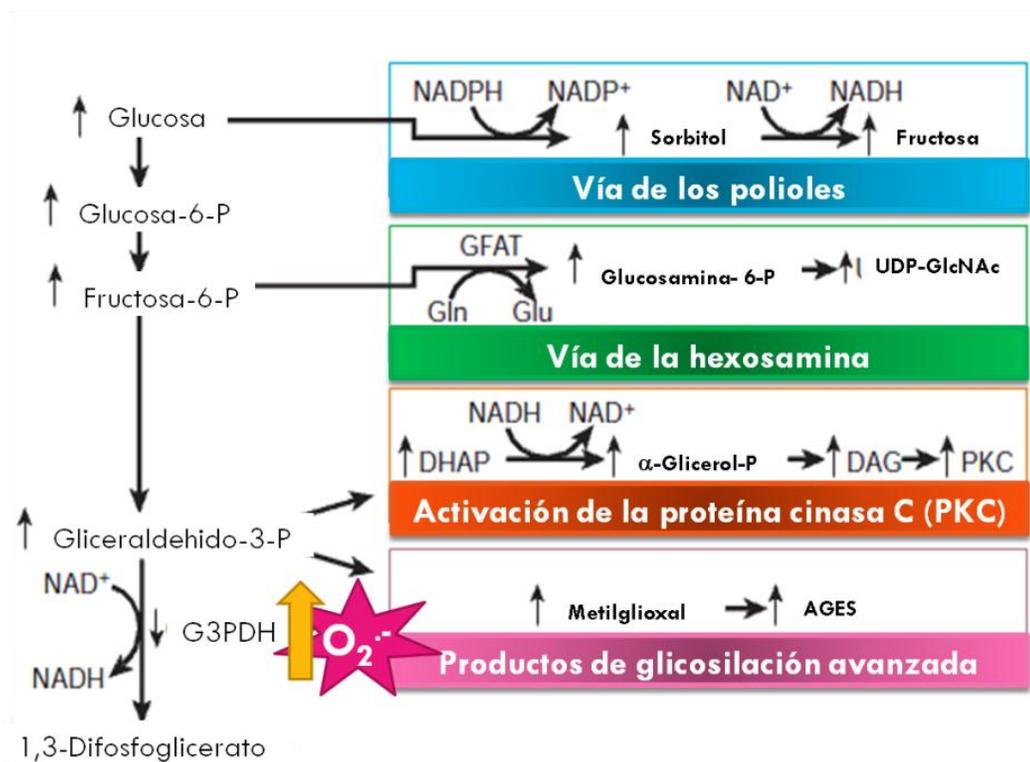


Figura 1. Mecanismos metabólicos relacionados con la hiperglucemia (Brownlee, 2001).

El desorden metabólico que ocasiona la alteración de los niveles de glucosa en sangre, así como los factores ambientales y genéticos del individuo, determinan la generación de una importante cantidad de moléculas oxidantes, entre las que se

destacan las especies reactivas del oxígeno (ERO), como el peróxido de oxígeno y el anión superóxido. Para su eliminación, el organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), y NADPH, así como el cofactor del glutatión (GSH) (Gutteridge y Halliwell, 2000).

El estrés oxidativo, ha sido relacionado con importantes acciones de daño como: peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, daño de ácidos nucleicos, inducción de factores de transcripción como NF- κ B, estimulación de la hipertrofia y proliferación celular o inducción de apoptosis (Tan y col., 2007). La auto-oxidación de la glucosa, los productos de glicosilación avanzada, la vía de los polioles, el aumento de NADH y, de manera crítica, las alteraciones del metabolismo mitocondrial son rutas que activan la generación de ERO. La mayoría de estos criterios están relacionados con daño vascular e inflamación.

II.3 Mediadores de la inflamación y su relación con las complicaciones de la diabetes.

Varios estudios han demostrado que la inflamación crónica parece ser un componente relacionado con las complicaciones que se presentan en la diabetes. Las proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno, la proteína sérica α -amiloide y varias interleucinas son factores predictivos de progresión y severidad de la diabetes, debido a que se asocian con la resistencia a la insulina y disfunción endotelial (Danesh y col., 1998; Saito y col., 2000; Ridker y col., 2007).

Las citocinas pro-inflamatorias son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polinucleares, células endoteliales, células epiteliales y células del tejido conjuntivo (renales, hepáticas, adipocitos y sanguíneas). Se sabe que la transcripción de las citocinas proinflamatorias está mediada por el factor nuclear de transcripción NF- κ B;

el cual induce la expresión de interleucinas, factor de necrosis tumoral α (TNF α) e ICAM y VCAM; ya que participan en el desarrollo de las complicaciones diabéticas (Sánchez y Kaski, 2001; Evans y col., 2002). Adicionalmente, la activación de NF- κ B también puede llevarse a cabo por la elevación de los ácidos grasos libres e hiperglucemia, ya que ocasionan un estado de estrés oxidativo; adicionalmente, el daño en el DNA, infección viral y radiación UV son otras vías que activan este factor (Figura 2). La regulación de NF- κ B, es crítico ya que se relaciona con un gran número de trastornos crónicos incluyendo diabetes y aterosclerosis (May y Ghosh, 1997).

II.3.1 Enfermedades cardiovasculares.

La dislipidemia es un factor importante en el desarrollo de aterosclerosis, se caracteriza por un incremento de las concentraciones de triglicéridos en sangre, disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Durante la diabetes, existe una incapacidad para almacenar ácidos grasos en el adipocito, por lo que aumenta su flujo del torrente sanguíneo al hígado, ocasionando un incremento en la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La hidrólisis mediada por la lipoproteína lipasa y lipasa hepática genera partículas de LDL pequeñas y densas, las cuales son más susceptibles al estrés oxidativo y poseen una mayor capacidad de filtración en la pared arterial.

Por otro parte, las moléculas de adhesión tales como VCAM e ICAM, atraen monocitos que maduran a macrófagos dentro de la arteria e internalizan las LDL oxidadas transformándose en células espumosas, las cuales producen más radicales libres y liberan nuevas citocinas para la atracción de macrófagos (Sánchez y Kaski, 2001; González-Maqueda, 2007; Palma, 2007). Estos procesos son claves en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis.

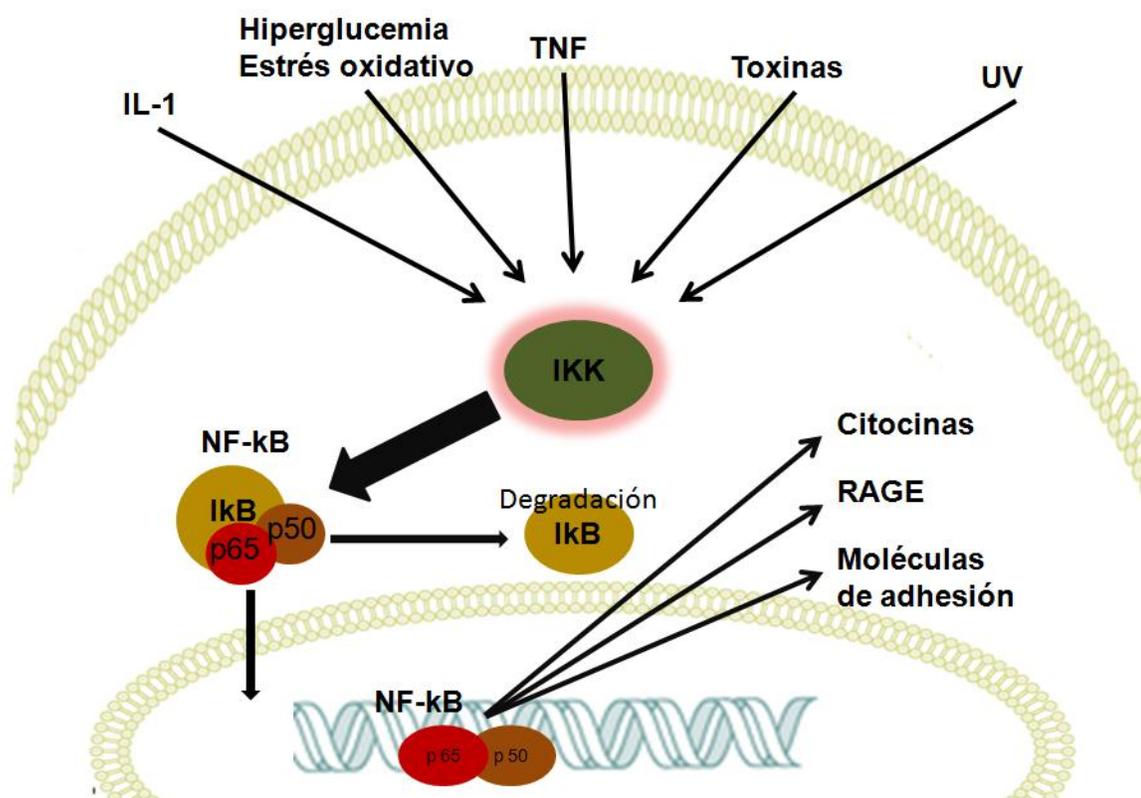


Figura 2. Modelos de activación del NF-κB, mediado por el aumento de glucosa, estrés oxidativo, citocinas y ácidos grasos libres, para la transcripción de proteínas inflamatorias.

II.3.2 Nefropatía diabética.

El estado de hiperglucemia crónica, en la diabetes, se ha asociado con el aumento en las ERO, ocasionando que se desarrollen complicaciones como la ND (Ha y col., 2008). Esta complicación se caracteriza por un deterioro progresivo en la función renal, lo cual se refiere, principalmente, a alteraciones en la eficiencia de la filtración de sangre en los riñones a nivel glomerular. La presencia de microalbúmina, proteínas o células epiteliales en la orina se relaciona directamente con disfunción renal (Wolf y col., 2002).

La elevación de niveles plasmáticos de citocinas, como TNF- α e IL-6, se correlaciona con la progresión de la ND (Esposito y col., 2002; Gómez-Fernández

y col., 2004), debido a que células renales como las células endoteliales, mesangiales, glomerulares y tubulares, expresan la proteína TNF- α , la cual estimula la expresión de moléculas de adhesión, como: VCAM e ICAM; estas se relacionan con procesos inflamatorios (Navarro, 2003). De aquí que el desarrollo de la ND llegue a provocar la pérdida del órgano.

II.4 Papel del receptor gamma activado del peroxisoma proliferador (PPAR- γ) y su relación con las complicaciones de la diabetes.

Los PPARs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y son factores de transcripción ligando dependientes que heterodimerizan con el receptor retinoico X y reconocen elementos de respuesta localizados en la región promotora de genes diana (Figura 3). Además de la participación directa en la transcripción de genes, los PPARs, también reprimen la transcripción de genes producidos por factores de transcripción proinflamatorios, NF-kB, proteína activadora 1 (AP-1) y el transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT-1); a través de la unión y el secuestro de sus cofactores correspondientes. Se han descrito tres formas de los PPARs: PPAR- α , PPAR- δ/β y PPAR- γ . Tanto PPAR- α como PPAR- γ juegan un papel importante en la diferenciación de células y la regulación de procesos de inflamación. Recientemente, PPAR- δ/β se ha relacionado con la respuesta inmune (Fan y col., 2008).

Por otra parte, el receptor más estudiado y caracterizado de este grupo es PPAR- γ . Este receptor se expresa en el tejido adiposo, riñón, tejido muscular, bazo, intestinos y páncreas; se involucra en el control general de la transcripción de numerosos procesos celulares, incluyendo el metabolismo de lípidos, homeostasis de la glucosa, procesos de diferenciación celular y procesos inflamatorios (Francis y col., 2003; Gildea y Van Bilsen 2003).

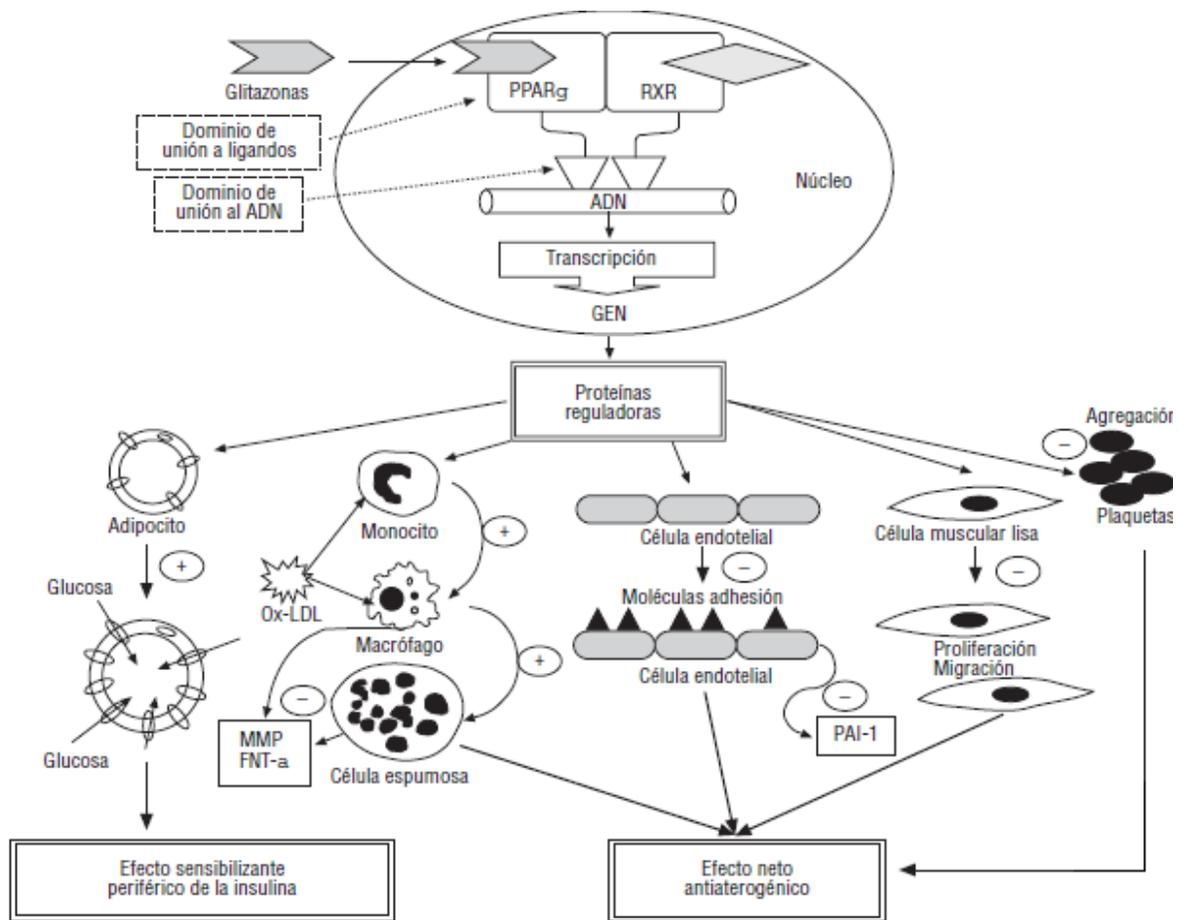


Figura 3. Representación esquemática del receptor y activado del peroxisoma proliferador y del receptor X retinoide, que actúan conjuntamente. En el núcleo de diversos tipos celulares regulan la transcripción de proteínas claves en el desarrollo del proceso de la aterosclerosis y de la resistencia a la insulina.

De acuerdo a los aspectos anteriores, PPAR- γ ha sido un blanco farmacológico para el tratamiento de las complicaciones de la diabetes, ya que su activación regula la expresión de genes que promueven la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa. Se ha observado que en pacientes diabéticos con insuficiencia renal que sufren glomerulopatía (la cual se caracteriza por la presencia de glomeruloesclerosis, aumento en el grosor de la membrana glomerular basal, hipertrofia glomerular) promueve una reducción progresiva en la tasa de filtración glomerular y reducción en la expresión de los niveles de ARNm de PPAR- γ , que se asocia a la acumulación de matriz como el colágeno IV y glomerulonefritis. Por lo

que, la activación de este receptor es importante, ya que reduce complicaciones renales como la albuminuria, previene el desarrollo de glomeruloesclerosis y glomerulonefritis mediante la supresión de NF- κ B (Figura 4), TGF- β , VEGF, PAI-1, colágeno IV y moléculas de adhesión (Utpal y Suresh, 2010).

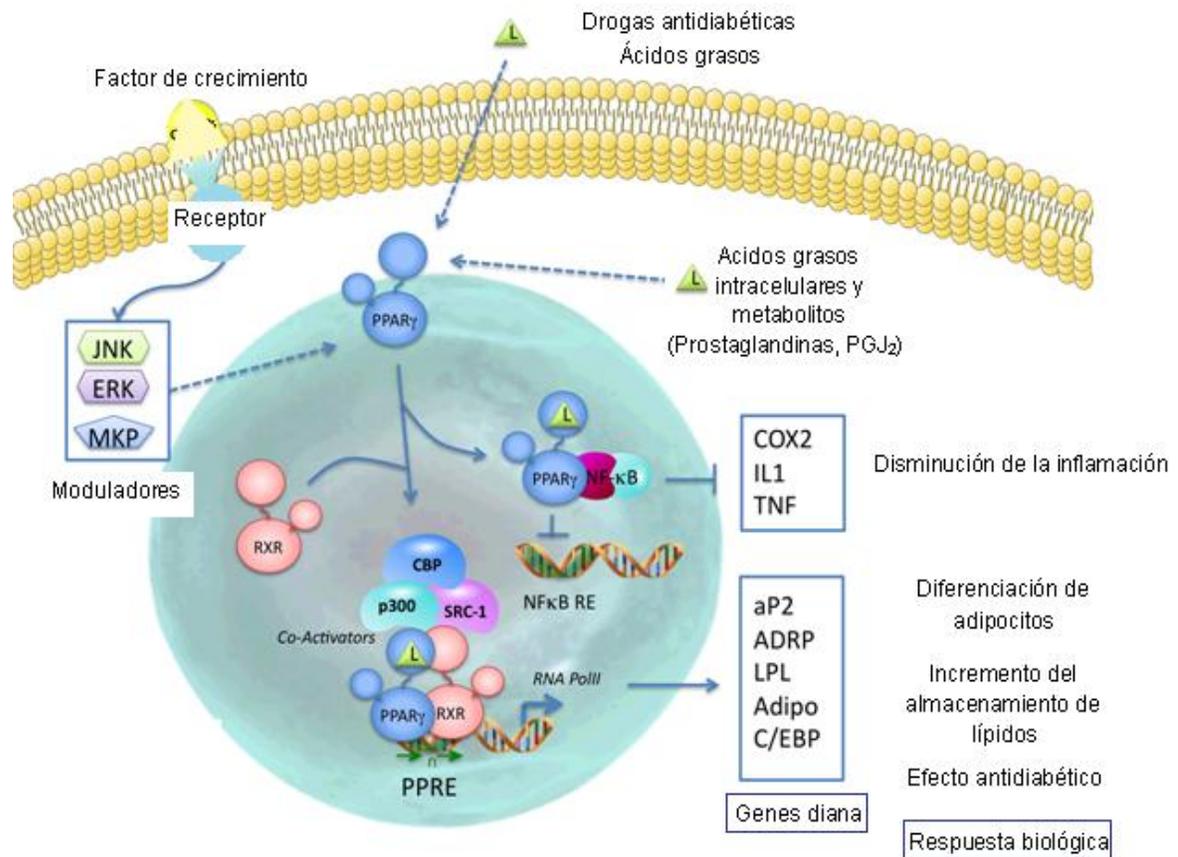


Figura 4. Activación de PPAR- γ y sus efectos biológicos.

II.5 Tratamientos para la diabetes.

En todo el mundo existen plantas con un potencial benéfico para la salud, dentro de estas se encuentra la flor de granada, la cual ha sido prescrita en la medicina tradicional Unani y Ayurvedic, para el tratamiento de diversas enfermedades, dentro de las cuales se encuentra la diabetes.

Dados los aspectos anteriores, se buscan tratamientos, en donde el primer blanco en el paciente diabético sea el control glucémico, así como una adecuada ingesta de nutrientes, que se enfoque al mantenimiento del peso corporal, niveles óptimos de glucosa y lípidos. Alternativo a esto, también se buscan tratamientos que tengan efecto sobre diversos mecanismos, como captación de radicales libres, inductores de respuesta de defensa celular, inhibidores de NF- κ B, inductores de la expresión de PPAR- γ (Figura 4), entre otros (Kanitkar y col., 2008).

II.6 Flor de granada (*Punica granatum* L.) y su relación con la diabetes.

II.6.1 Generalidades.

Punica granatum Linn pertenece a la familia Punicaceae, conocida comúnmente como granada, es un árbol pequeño que mide entre 3 y 6 m de altura, sus hojas son opuestas, lanceoladas y de un color verde-rojo; tiene flores de color rojo naranja, la mayoría de ellas son solitarias aunque a veces se encuentran unidas 2-4; los frutos son globosos y rojos, con numerosas semillas carnosas, comestibles y de color rojo (Vit y Corao, 2004); es originaria de Europa y sur de Asia. En México, las principales regiones productoras en México son: Guanajuato, Oaxaca, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí y Aguascalientes; siendo la región del Bajío, una de las zonas en donde se da una mayor producción, debido a que las condiciones climáticas de la zona favorecen su cultivo.

Por otra parte, el fruto del árbol de la granada se ha estimado durante mucho tiempo como una fuente nutricional de alimento, ya que contiene pequeñas proporciones de fibra alimentaria y sodio, es rica en potasio y aporta cantidades considerables de calcio, magnesio, fósforo, hierro y vitamina C; además de que contiene importantes compuestos bioactivos, tales como: ácido gálico, ácido elágico, punicalagina, catequina, entre otros (Wang y col., 2010). Esto a dado pauta a que se investiguen otras partes de la planta con posible beneficio sobre la salud, tales como la flor de granada. Esta ha sido utilizada con fines terapéuticos

relacionados con la diarrea crónica, disentería, colitis y trastornos uterinos (Sivarajan y col., 1994; Warriar y col., 1995). En la medicina tradicional se ha prescrito a la flor de granada para el tratamiento de la diabetes.

II.6.2 Efecto antidiabético de la flor de granada.

Estudios relacionados con extractos de flor de granada han mostrado una importante actividad hipoglucémica (Li y col., 2005), tolerancia a la glucosa, disminución de triglicéridos (TG), colesterol total (CT) y lipoproteínas de baja densidad (LDL-C); así como un incremento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) en suero (Bagri y col., 2009) y un potente efecto antioxidante (Gurpreet y col., 2006). Se ha demostrado que el efecto antioxidante y antidiabético de las flores y jugo de granada está asociado con su contenido de compuestos fenólicos (Faria y col., 2007; Tzulker y col., 2007). Adicionalmente, la activación de PPAR- γ se ha visto implicada en tratamientos con extractos de flor de granada; en donde la administración a largo plazo de un extracto de flor de granada mejora el metabolismo de lípidos, mediado por la activación de PPAR- γ (Huang y col., 2005).

En base a lo anterior se demuestra que la flor de granada presenta propiedades antidiabéticas importantes. Sin embargo, no existen trabajos que reporten los efectos del consumo de extractos acuosos de flor de granada sobre daño renal, por lo que en este trabajo se propone evaluar el efecto de extractos acuosos de flor de granada sobre hiperlipidemia, hiperglucemia y daño renal en ratas diabéticas.

II. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de flor de granada de selecciones mejoradas poseen un potencial antioxidante e hipoglucemiante capaz de proteger contra daño renal, en un modelo de diabetes tipo 1.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General.

Evaluar el efecto de extractos acuosos de flor de granada (*Punica granatum* L.) de selecciones obtenidas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias sobre el control de las complicaciones de la diabetes, como hiperglucemia y daño renal, en un modelo animal de diabetes, tipo I, inducida con estreptozotocina (STZ).

IV.2 Específicos.

- Cuantificar los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos acuosos de las selecciones mejoradas de flores de granada (*Punica granatum* L.).
- Determinar el efecto de los extractos acuosos de flor de granada sobre la hiperglucemia e hiperlipidemia en ratas diabéticas inducidas con STZ.
- Evaluar el efecto protector de la flor de granada sobre el daño renal, mediante marcadores bioquímicos y moleculares.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales.

V.1.1 Productos químicos y reactivos.

- 2,2'-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico) (ABTS).
- 6-hidroxi-2-tetramethylchroman-2-ácido carboxílico (Trolox®).
- Folin-Ciocalteus de la marca Sigma-Aldrich (Stainheim, Germany).
- Estreptozotocina (STZ) de la marca Sigma®.
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa en suero, marca ACCUTREND.
- Tiras reactivas para el examen general de orina, Multistix 10SG, marca Bayer.
- Tiras reactivas para la determinación de Microalbumina en orina, Clinitek, marca Bayer.
- Kits para la determinación de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en suero, marca Randox Laboratories.
- Anticuerpos monoclonales de PPAR γ y Actina de la marca Santa Cruz.
- Soluciones de revelado y placas fotográficas marca Kodak.
- Kit Rneasy para extracción de RNA por columna marca QIAGEN.
- Kit de RT-PCR One Step.

V.1.2 Material biológico.

Las flores de granada se obtuvieron a partir de la cosecha de abril del 2008 en la Estación de Investigación Bajío (INIFAP), ubicado en Celaya, Gto, México. Las selecciones que se utilizaron fueron: 37-12, 39-12, 38-7, 36-3, 38-2, 39-9, 31-6, 39-7 y 34-1, caracterizadas por su color naranja, rojo y rojo oscuro y floración abundante. Las flores fueron recogidas después de su caída natural en una malla

de tela de polipropileno (Agribon ®) para evitar contaminación con el suelo. La tela fue colocada debajo de las copas de los árboles. Posteriormente fueron secadas al sol durante tres días.

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g de peso corporal), obtenidos de Rismart SA, México. Los animales permanecieron a 20-25 °C con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas y con libre acceso al agua y una dieta base (Zeigler rat chow).

V.2 Métodos.

V.2.1 Preparación del extracto acuoso de flor de *Punica granatum* (FPG).

1 g de la flor molida se adicionó a 100 mL de H₂O-destilada, posteriormente se puso en ebullición durante 10 min y se agitó durante 1 h y se filtró en papel filtro Whatman 3 Chr. Finalmente, se restituyó el volumen para obtener una concentración final al 1 % (peso/volumen).

V.2.2 Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 760 nm.

Para la cuantificación de fenoles totales, se utilizaron 20 µL del extracto y se llevaron a un volumen total de 500 µL, esto se mezcló con 250 µL del reactivo de

Folin-Ciocalteu (1 N) y después se adicionaron 1250 μL de Na_2CO_3 (20 %), se dejó reposar en obscuridad por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia a 760 nm. La cuantificación se realizó interpolando los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 μg). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de flor seca (mg eq. AG/g de flor seca).

V.2.3 Determinación de antocianinas.

La extracción y cuantificación de antocianinas se llevó a cabo por el método de Abdel-Aal y Hucl (1999). 500 μL del extracto se mezclaron con 4 mL de etanol acidificado (etanol en HCl 1N, 85:15 V/V). La solución se ajustó a pH 1 con HCl 1N y se agitó por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 27,200 g por 30 min y se recuperó el sobrenadante, el cual se llevó a un volumen final de 10 mL. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-visible a 535 nm y la concentración de antocianinas totales en la muestra (mg/g) se calculó como cianidina 3-glucósido, según la siguiente fórmula:

$$C = (A/\epsilon) \times PM \times (V/0.5) \times 1000 \times (10 \text{ mL}/1 \text{ g de muestra})$$

Donde:

C.- Concentración de antocianinas totales (mg/g de flor seca).

A.- Lectura de la absorbancia,

ϵ .- Coeficiente de absortividad molar de la cianidina 3-glucósido ($25\,965 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$),

V.- Volumen total del extracto

PM.- Peso molecular de la cianidina 3-glucósido (449 g/mol).

V.2.4 Ensayo de ABTS.

La capacidad antioxidante *in vitro* se evaluó por el método de Arts y col., (2003), mediante el ensayo de ABTS. Para producir el radical, el ABTS (2,2'-

azinosbis-(2-aminodinopropano-HCl)) se mezcló 12 h antes de su uso con persulfato de potasio 2.5 mM. El radical se diluyó con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 hasta obtener una absorbancia final de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Al obtener la absorbancia adecuada, se mezcló la solución de ABTS⁺ con la muestra, en una relación de 1:100 (1 μ L de muestra en 99 μ L de ABTS⁺) y se midió la absorbancia de la muestra a los 6 minutos de transcurrida la reacción y a la misma longitud de onda. Para obtener los equivalentes de trolox (mM eq. de trolox/g de flor seca), se realizó una curva estándar de trolox preparado con etanol (0-800 μ M). La concentración de equivalentes de trolox se calculó mediante la relación lineal de la disminución de la absorbancia en una relación molar.

V.2.5 Estudios *in vivo*.

V.2.5.1 Inducción de la diabetes.

La diabetes, en los animales, fue inducida con una inyección intraperitoneal (i.p) de estreptozotocina (STZ 50 mg/kg de peso corporal) diluida en un buffer de citratos (0.1M, pH=4.5) después de un periodo de ayuno de 12 h. El desarrollo de la diabetes se confirmó mediante la concentración de glucosa en suero, una semana después de la inducción con STZ. Ratas con niveles de glucosa entre 180-240 mg/dL fueron consideradas para el experimento.

V.2.5.2 Grupos de estudio.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de 7 animales cada uno; control sano, control diabético, diabético con extracto (38-2), diabéticos con extracto (39-7). El extracto acuoso de FPG (1%) se administró 7 días después de la inducción con STZ, durante tres semanas. Los niveles de glucosa en sangre en

ayuno y el aumento de peso se determinaron semanalmente. El consumo de alimento y de agua potable se registró diariamente.

V.2.5.3 Determinación de glucosa.

El nivel de glucosa (mg/dL) se cuantificó en la sangre obtenida de la vena caudal de los animales (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo de 8 h en ayuno. Para ello, se utilizó un glucómetro de la marca ROCHE, cuya sensibilidad va de 20-600 mg/dL de glucosa y tiras reactivas de la marca Accutrend.

La medición se lleva a cabo a través de bioamperometría, la cual mide la corriente generada al convertir la glucosa de la muestra de sangre (colocada sobre la tira) en gluconolactona por la enzima deshidrogenasa.

V.2.6 Sacrificio y obtención de muestras.

Al final de las tres semanas de estudio, se sacrificaron las ratas por medio de anestesia con éter etílico. Una vez anestesiadas, se tomaron muestras de sangre por medio de punción cardíaca y se cortó la arteria principal. Posteriormente se extrajeron los riñones, los cuales se pesaron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarse a -70 °C hasta su utilización.

V.2.7 Determinación del perfil de lípidos.

Se obtuvo el suero a partir de la sangre obtenida en el sacrificio de los animales. La determinación de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL se realizó utilizando kits enzimáticos estándares de la marca Randox (Atrim, Reino Unido).

a) Los triglicéridos presentes en suero reaccionan con una lipasa para formar glicerol. El glicerol, convertido a glicerol-3-fosfato por la enzima glicerol cinasa, reacciona con la enzima glicerol fosfato oxidasa para formar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con la enzima con 4-aminoantipirina/p-clorofenol y a través de la enzima peroxidasa se lleva a cabo la formación de un compuesto de color rojo intenso llamado quinoneimina, el cual se lee espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

b) El colesterol se determina con el indicador quinoneimina que se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Los ésteres de colesterol presentes en la muestra reaccionan con la enzima colesterol esterasa para liberar colesterol, que al reaccionar de nuevo con esta enzima produce colesteno-3-ona y peróxido de hidrógeno, a partir del cual se obtiene el indicador antes mencionado, que se lee a una longitud de onda de 546 nm.

c) Las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotungstico en presencia de iones magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determinara en la fracción HDL que queda en el sobrenadante. Por lo que esta determinación se basa en el mismo principio que la determinación enzimática de colesterol.

La concentración de LDL se determinó por medio de la fórmula de Friedewald (Rijks, 1995).

V.2.8 Evaluación del daño renal en ratas diabéticas.

Para evaluar el daño renal, se realizaron determinaciones de parámetros bioquímicos y moleculares. Tales parámetros constaron de la determinación del peso relativo del riñón, proteína y microalbúmina en orina; en riñón se determinó el

contenido de GSH y la actividad de GST en un homogenizado de este órgano; además se determinó la expresión de la proteína PPAR- γ y el transcrito de VCAM-1 en riñón, para evaluar el estado inflamatorio.

V.2.8.1 Determinación de microalbúmina y proteína en la orina.

Los animales fueron separados en jaulas individuales sin alimento y con acceso libre a agua. La orina se recolectó en un lapso de 12 h, previas al sacrificio, para estudios bioquímicos. Para la determinación de proteínas se emplearon tiras reactivas Multistix 10SG. La lectura de ambos parámetros se realizó en un analizador Clinitek. Para la detección de microalbúmina se utilizaron tiras reactivas Microalbumin cuya lectura se realizó en el mismo equipo.

V.2.8.2 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST).

El tejido de riñón se homogenizó en una solución de Tris-HCl/sacarosa 50 mM-0.25 M, pH 7.0, en un politron y se centrifugó a 10,000 g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró con cuidado y luego se centrifugó a 100,000 g durante 1 h a 4 °C (Ramos-Gómez y col., 2001) obteniéndose la fracción citosólica. Todas las fracciones citosólicas o sobrenadantes se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

La actividad de GST fue estimada por el método de Habig y col, (1974). La mezcla de reacción consistió en 50 μ L de citosol diluido, 100 μ L de GSH (3 mM) 150 μ L de CDNB (2 mM) (diluidos en buffer de fosfatos 0.1M, pH 6.5). Los cambios en la absorbancia se registraron a 340 nm y la actividad enzimática se expresó como nmol de GST/min*mg de proteína usando un coeficiente de extinción molar de 9.63 mM⁻¹ cm⁻¹.

V.2.8.3 Estimación de glutatión reducido (GSH) por medio de (DTNB).

La GSH se determinó por el método de Ellman's (1959) basándose en la habilidad del grupo SH para reducir el DTNB (5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)). 150 μ L de la fracción citosólica se precipitaron con 30 μ L de ácido tricloroacético (20% v/v) en un volumen total de 300 μ L. La mezcla de reacción consistió en 150 μ L buffer Tris-EDTA (pH 8.2), 50 μ L del sobrenadante, 80 μ L de metanol y 20 μ L de DTNB, el desarrollo de color se midió a 412 nm. La concentración de GSH en las muestras se determinó usando una curva estándar de GSH (0 a 200 μ M). El contenido de GSH se expresó en μ g de GSH/mg de proteína. La concentración de proteínas en la fracción citosólica se determinó con el ácido bicinconínico (BCA) protein assay (Pierce Inc., Rockford, IL), usando albúmina de suero bovino como estándar.

V.2.8.4 Determinación de los niveles de la proteína PPAR- γ en riñón.

Esta determinación se realizó mediante la técnica molecular de Western blot, utilizando un anticuerpo mononuclear de ratón para el factor de transcripción PPAR- γ , de la marca Santa Cruz Biotechnology.

El tejido de riñón se homogenizó en una solución de lisis con una mezcla de inhibidores de proteasas. El homogenizado se agitó por 45 min a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 16000 g por 30 min a 4 °C. La concentración de proteínas en el lisado se determinó mediante el método Lowry y col. (1951). Posteriormente, se llevo a cabo la digestión de las muestras y se realizó una electroforesis SDS-PAGE para la separación de las proteínas presentes en las muestras. Una vez transcurrida la electroforesis se llevó a cabo una transferencia semi-seca, empleando una membrana de nitrocelulosa. Finalmente se realizó un inmuno-blot. Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo (1:1250) durante 2 h 30 min. Las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo durante 1 h con una dilución 1:1000. Las proteínas fueron detectadas por

quimioluminiscencia y el revelado se realizó en películas fotográficas Kodak (USA), empleando una solución reveladora y una fijadora. Las películas se digitalizaron y se obtuvo el área de pixeles de las bandas mediante el programa ImagenJ 1.39d. Para cuantificar la expresión de la carga de proteína en la membrana, ésta se normalizó con la proteína β -actina. β -actina se determinó mediante re-blotting de las membranas. Los valores fueron reportados como la relación del área de pixeles entre la proteína de interés y la proteína β -actina.

V.2.8.5 Determinación de la expresión del transcrito de VCAM-1 en riñón por RT-PCR.

V.2.8.5.1 Aislamiento de RNA.

La extracción de ARN total se realizó por medio de un kit de extracción en columna (RNeasy), el cual se basa en la unión del ARN con la membrana de la columna, por medio de soluciones que contienen altas concentraciones de sales, permitiendo que el ARN total se una a la membrana sílica.

De los riñones almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tomó una fracción de 20–30 mg. Inmediatamente, se trituró en nitrógeno líquido y se homogenizó con buffer RLT. Se adicionó al lisado un volumen de etanol al 70%. La muestra se colocó en la columna y se realizaron 4 lavados. Finalmente, el ARN unido a la membrana, fue eluído con agua libre de RNasas y se determinó la concentración y pureza por espectrofotometría.

V.2.8.5.2 Transcripción y amplificación.

Los niveles relativos de ARNm se evaluaron mediante la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), usando la enzima SuperScriptTM One-Step RT-PCR with Platinum[®] Tag (Invitrogen). Para la

amplificación, se diseñaron secuencias específicas para las proteínas de interés (Cuadro 1).

Los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual se tiñó con bromuro de etidio. La imagen del gel se capturó digitalmente con un foto-documentado (Bio-Rad, USA) y analizada con el programa ImagenJ 1.39d. Los valores del RT-PCR se presentaron como la relación de la señal específica del gen en el ciclo de amplificación lineal seleccionado dividido entre la señal de GAPDH.

Cuadro 1. Secuencia de primers para la amplificación por PCR.

	Secuencia	Longitud (bp)	Temperatura Alineamiento (°C)	Ciclos (n)
GAPDH		575	58	35
Sentido	5'-TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3'			
Antisentido	5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'			
VCAM-1		785	55	35
Sentido	5'-CGGTCATGGTCAAGTGTTTG-3'			
Antisentido	5'-CTCCAGTTTCCTTCGCTGAC-3'			

V.2.10 Análisis estadístico.

Todos los datos se presentaron como la media \pm error estándar (EE) de un análisis por triplicado. Las diferencias en el contenido fenólico y capacidad antioxidante entre los extractos acuosos de las flores se calcularon mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la comparación de las medias por el método de Tukey-Kramer. Para el estudio *in vivo*, la diferencia entre grupos se

calculó comparando las medias de cada tratamiento con el control diabético por el método de Dunnet. Adicionalmente, la diferencia entre tratamientos se calculó comparando las medias por el método de la *t*-student. Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.

VI. RESULTADOS

VI.1 Composición química y capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de FPG.

El Cuadro 2 muestra el contenido de fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante de los extractos acuosos de diferentes selecciones de flores secas de granada. Se observa que las flores de color naranja contienen una concentración de fenoles totales que va de 174 a 203 mg eq. AG/g, las flores de color rojo contienen entre 147-187 mg eq. AG/g y las flores rojo oscuro 96-119 mg eq. AG/g. En contraste, el contenido de antocianinas fue más alto en las flores de color rojo oscuro (1.08-1.81 mg/g) y en las flores de color rojo (1.17-1.53 mg/g), comparando con las flores naranjas (0.31-0.88 mg/g); siendo las selecciones 38-7 (1.81 mg/g) y 38-2 (1.53 mg/g) las que contienen mayor concentración de antocianinas. Adicionalmente, se observa que el extracto acuoso de la selección 39-9 mostró la mayor capacidad antioxidante (1011 mM eq. Trolox/g de flores secas). Similares resultados se observaron para las selecciones 34-1 y 39-7 (990 mM eq. Trolox/g y 968 mM eq. Trolox/g, respectivamente).

Los resultados sugieren que las selecciones 39-7 y 34-1 así como las selecciones 39-9 y 38-2 podrían ser los materiales más interesantes para evaluarse el efecto protector contra la diabetes, considerándose de mayor importancia las selecciones 38-2 y 39-7 para el estudio *in vivo*.

VI.2 Efecto del extracto de FPG sobre hiperglucemia en ratas diabéticas.

La Figura 5 muestra los niveles de glucosa en sangre en ratas sanas, diabéticas y diabéticas con tratamiento durante un periodo experimental de 3 semanas. Tras la administración de STZ, los grupos diabéticos mostraron un incremento significativo ($P < 0.05$) de los niveles de glucosa (>250 mg/dL) comparado con el control sano. De acuerdo a los niveles de glucosa en sangre se

observa que el grupo tratado con la selección 38-2 ejerce un efecto hipoglucemiante hasta la tercera semana de tratamiento.

Cuadro 2. Contenido de fenoles y capacidad antioxidantes de los extractos acuosos de flores secas de granada (*Punica granada* L.).

Color	Selecciones	Fenoles totales (mg eq. AG/g de flores secas)	Antocianinas (mg eq. C3G/g de flores secas)	TEAC (mM eq. Trolox/g de flores secas)
Rojo oscuro	37-12	96.7±4.0 ^f	1.08±0.17 ^f	211±21 ^e
	39-12	108.3±7.1 ^f	1.41±0.05 ^d	343±46 ^d
	38-7	119.6±5.6 ^e	1.81±0.09 ^b	362±19 ^d
	36-3	147.9±3.3 ^d	1.30±0.05 ^h	674±18 ^c
Rojo	38-2	176.3±2.4 ^c	1.53±0.08 ^c	829±68 ^b
	39-9	187.7±0.5 ^{bc}	1.17±0.04 ^e	1011±38 ^a
Naranja	31-6	174.6±15.9 ^c	0.31±0.06 ^k	769±23 ^{bc}
	39-7	203.0±3.2 ^a	0.805±0.01 ⁱ	968±41 ^a
	34-1	182.4±12.6 ^{bc}	0.88±0.03 ^g	990±44 ^a

Los datos se expresaron como la media ± E.E de un análisis por triplicado. Diferentes letras indican diferencia estadística ($P < 0.05$) significativa entre selecciones.

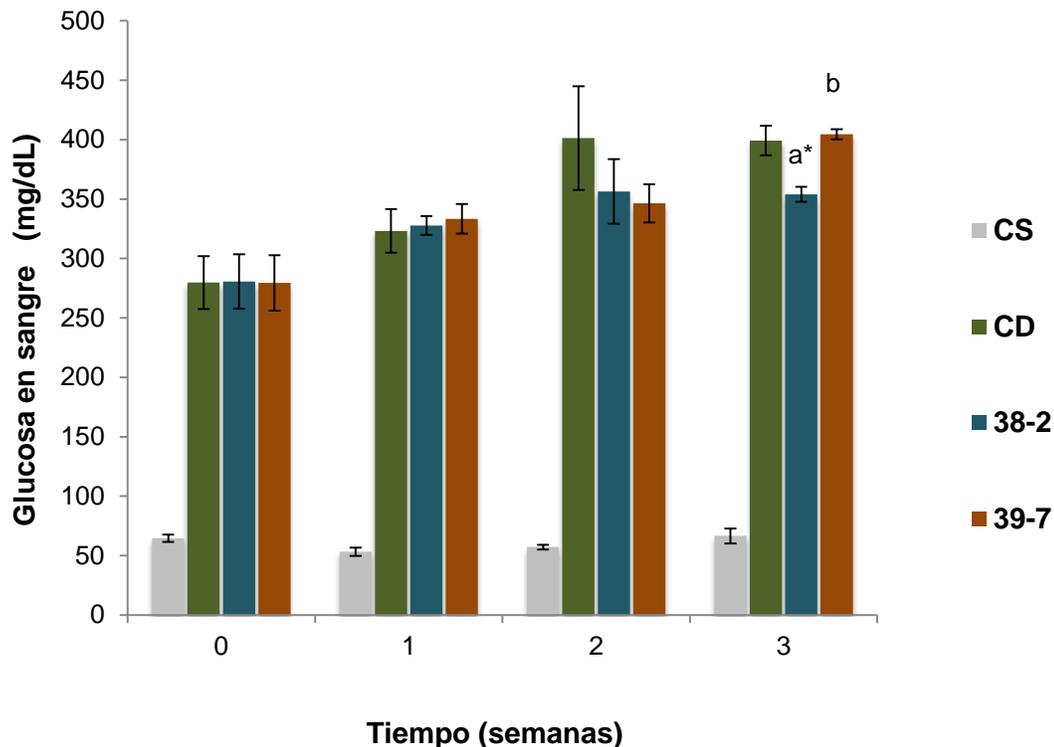


Figura 5. Efecto de los extractos acuosos de flor de granada (1%) sobre los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas (Los datos se expresaron como la media \pm E.E., $n=7$. ^{a,b}Indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre grupos tratados con FPG. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) comparando con el control diabético. CS: control sano; CD: control diabético; 38-2: diabético con tratamiento; 39-7: diabético con tratamiento).

VI.3 Efecto del extracto de FPG sobre hiperlipidemia.

El Cuadro 3 muestra los niveles de triglicérido (TG), colesterol total (CT), HDL-C y LDL-C en animales sanos, diabéticos y diabéticos con tratamiento. El resultado de la administración de STZ es la elevación significativa ($P < 0.05$) de los niveles de TG, CT y LDL-C en ratas diabéticas, sin presentar ninguna alteración en los niveles de HDL-C, comparado contra el control sano. En las ratas diabéticas tratadas con la selección 38-2 se observa una disminución significativa ($P < 0.05$) en los niveles de TG y LDL-C comparado contra el control diabético, logrando alcanzar los niveles que se observan en el control sano. El grupo tratado con la

selección 39-7 no muestra una disminución significativa en TG, CT y LDL-C comparado con el control diabético. Así mismo, ninguno de los dos tratamientos muestra una elevación de los niveles de HDL-C. En los parámetros de TG, CT y HDL-C, no hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dos tratamientos.

Cuadro 3. Efecto de los extractos de flores de granada secas sobre el perfil de lípidos en ratas diabéticas.

Grupos	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
CS	62.7 ± 4.4	50.8 ± 2.1	20.6 ± 2.1	16.8 ± 1.6
CD	118.2 ± 12.6	72.0 ± 3.2	27.6 ± 1.4	21.0 ± 0.5
38-2	69.0 ± 9.5*	64.0 ± 5.0	24.7 ± 4.0	15.9 ± 3.5 ^{a*}
39-7	85.0 ± 21.5	70.2 ± 7.9	26.2 ± 4.1	38.7 ± 7.1 ^b

Los datos se expresaron como la media ± E.E. (n=7). ^{a,b}Indican diferencia estadística ($P < 0.05$) entre grupos tratados con FPG. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) comparado con el control diabético. CS: control sano; CD: control diabético; 38-2: diabético con tratamiento; 39-7: diabético con tratamiento.

VI.4 Evaluación de la función y daño renal en ratas diabéticas.

VI.4.1 Determinación de marcadores bioquímicos en orina de ratas diabéticas.

La función renal se evaluó mediante los niveles de microalbúmina y proteína en orina, así como el peso relativo del riñón de los diferentes grupos de animales experimentales (Cuadro 4). En el control diabético se elevaron significativamente ($P < 0.05$) los niveles de proteína y microalbúmina en orina, así como el peso relativo del riñón comparado con el control sano. El grupo tratado con la selección 38-2 muestra una reducción significativa ($P < 0.05$) en los niveles de proteína y microalbúmina en orina, así como también en el peso relativo del riñón comparando con el control diabético. El grupo 39-7 no muestra reducción en ninguno de los parámetros analizados con respecto al control diabético.

VI.4.2 Efecto del extracto de FPG sobre el contenido de GSH y la actividad de GST.

El potencial antioxidante *in vivo* de los extractos de FPG se evaluó mediante los niveles de GSH y GST en tejido de riñón de ratas sanas, diabéticas y diabéticas con tratamiento (Cuadro 5). La administración de STZ indujo una disminución significativa ($P < 0.05$) en los niveles GSH en el control diabético, con respecto al control sano; sin embargo, la actividad de GST aumento en el control diabético. Los grupos con tratamiento muestran un aumento significativo ($P < 0.05$) tanto en los niveles de GSH como en la actividad de GST comparado con el control diabético.

VI.4.3 Efecto del extracto de FPG sobre la expresión de la proteína PPAR- γ en riñón.

Para evaluar la protección contra daño renal inducida por hiperglucemia e hiperlipidemia en ratas diabéticas, se cuantificaron los niveles de la proteína PPAR- γ en tejido de riñón. Como se esperaba, los niveles de PPAR- γ en ratas diabéticas fueron significativamente menores ($P < 0.05$) que los niveles del control sano (Figura 6). Sin embargo, la expresión de PPAR- γ en los animales con tratamiento (38-2 y 39-7) no aumento significativamente con respecto al control diabético. Sin embargo, se observa una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos con tratamiento, siendo mayor los nivel en el grupo tratado con la selección 38-2.

Cuadro 4. Efecto de extractos de flores secas de granada sobre parámetros de función renal en ratas diabéticas.

Grupos	Peso relativo del riñón x 1000	Proteína (mg/24h)	Microalbúmina (mg/24hr)
CS	6.6 ± 0.3	3.2 ± 0.4	0.72 ± 0.04
CD	12.2 ± 0.4	5.5 ± 0.8	2.42 ± 0.51
38-2	9.6 ± 0.2*	0.4 ± 0.0 ^{a*}	1.46 ± 0.03 ^{a*}
39-7	11.0 ± 0.4	4.6 ± 0.8 ^b	2.5 ± 0.46 ^b

Los datos se expresaron como la media ± E.E. (n=7). ^{a,b}Indican diferencia estadística ($P < 0.05$) entre grupos tratados con FPG. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) comparado con el control diabético. CS: control sano; CD: control diabético; 38-2: diabético con tratamiento; 39-7: diabético con tratamiento.

Cuadro 5. Efecto de extractos de flores de granada seca sobre el contenido de GSH y la actividad de GST.

Grupos	GSH (µg/mg proteína)	GST (nmol/min * mg proteína)
CS	8.1 ± 0.9	299 ± 6.0
CD	5.3 ± 0.3	355 ± 14.5
38-2	7.4 ± 0.4*	566 ± 40.2*
39-7	6.9 ± 0.4*	538 ± 34.0*

Los datos se expresaron como la media ± E.E. (n=7). ^{a,b}Indican diferencia estadística ($P < 0.05$) entre grupos tratados con FPG. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) comparado con el control diabético. CS: control sano; CD: control diabético; 38-2: diabético con tratamiento; 39-7: diabético con tratamiento.

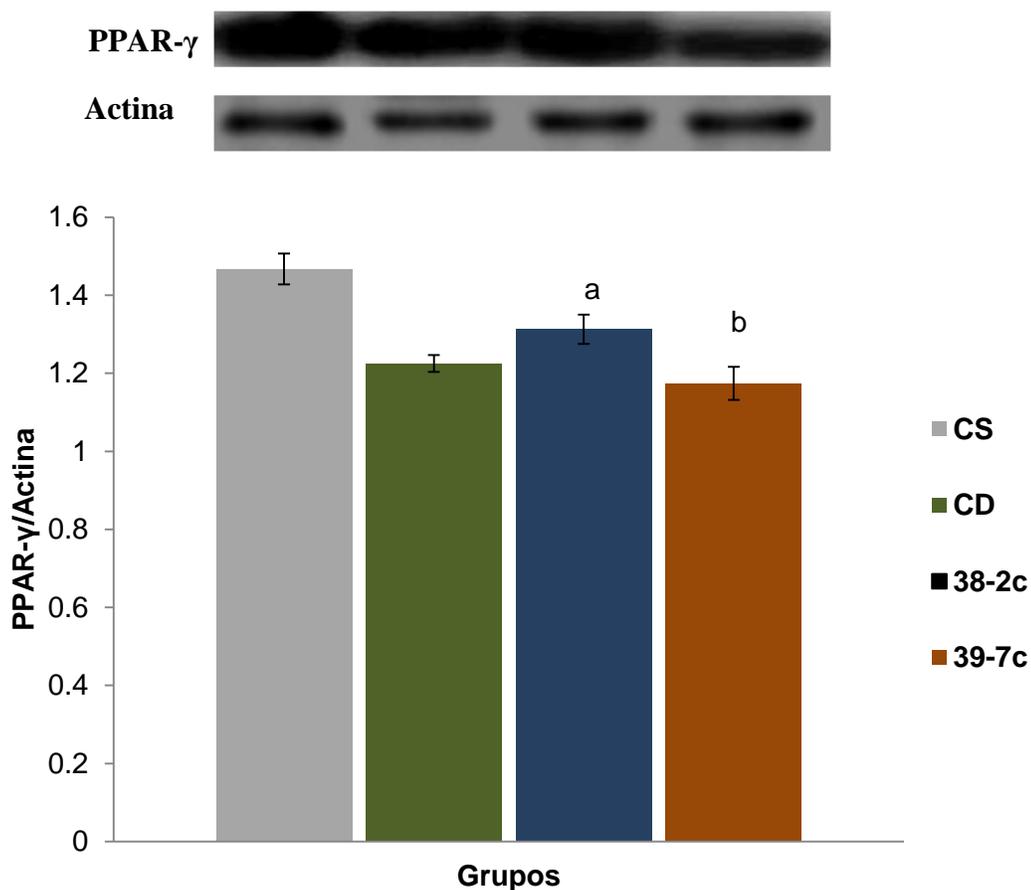


Figura 6. Efecto de los extractos acuosos de flor de granada sobre los niveles de la proteína PPAR- γ en riñón (Los datos se expresaron como la media \pm E.E. (n=7). ^{a,b}Indican diferencia estadística ($P < 0.05$) entre grupos tratados con FPG. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) comparado con el control diabético. CS: control sano; CD: control diabético; 38-2: diabético con tratamiento; 39-7: diabético con tratamiento).

VI.4.4 Efecto del extracto de FPG sobre la expresión de VCAM-1

Dado que PPAR- γ inhibe la expresión de VCAM-1 mediante la inhibición del factor NF- κ B, el control diabético muestra una elevación significativa ($P < 0.05$) en los niveles de ARNm de VCAM-1 con respecto al control sano (figura 7). Interesantemente, se observa una reducción significativa en los niveles de ARNm de VCAM-1 del grupo diabético tratado con la selección 38-2 con respecto al

control diabético. Esto puede ser parcialmente relacionado con el aumento en los niveles de PPAR- γ en este mismo grupo.

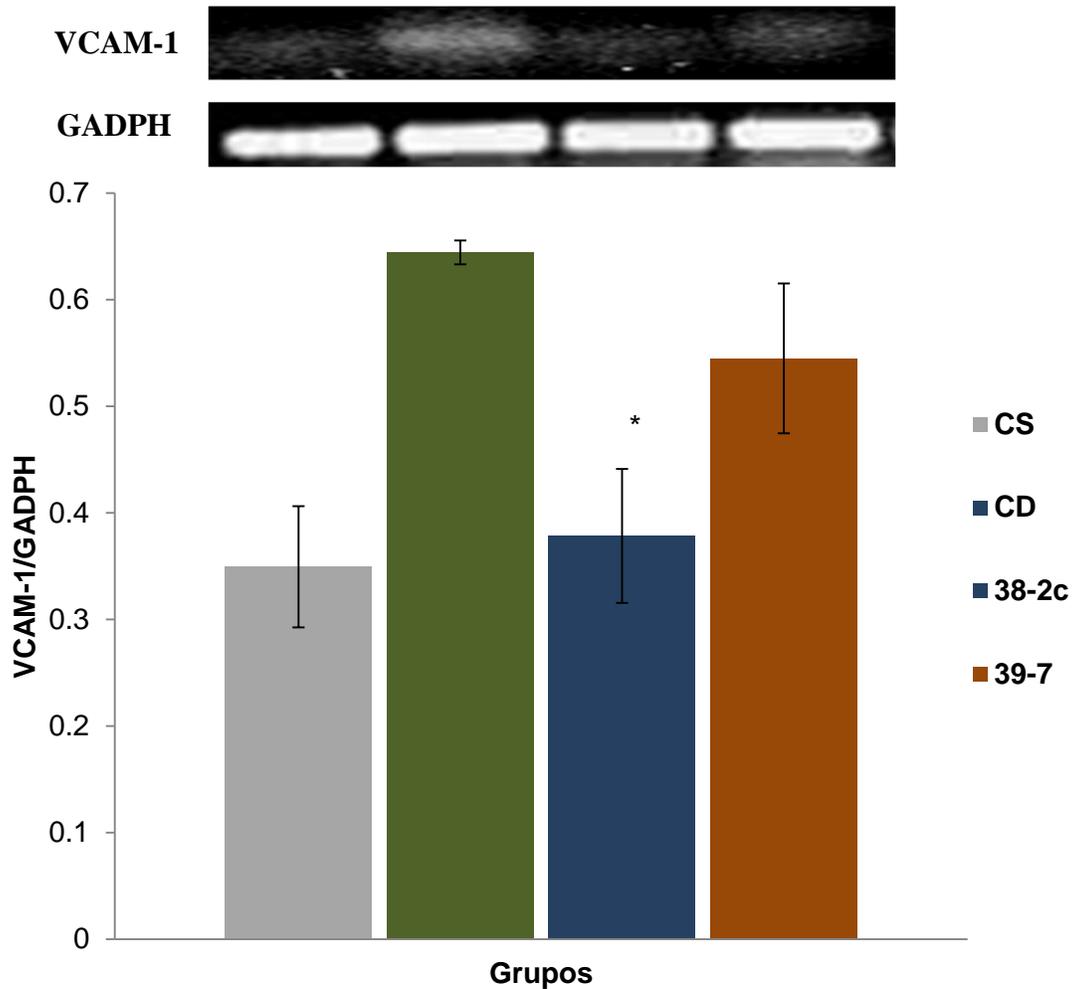


Figura 7. Efecto de los extractos acuosos de flor de granada sobre la expresión de VCAM-1 en riñón (Los datos se expresaron como la media \pm E.E. (n=7). ^{a,b}Indican diferencia estadística ($P < 0.05$) entre grupos tratados con FPG. *Indica diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) comparado con el control diabético. CS: control sano; CD: control diabético; 38-2: diabético con tratamiento; 39-7: diabético con tratamiento).

VII DISCUSIÓN

Desórdenes clínicos severos: hiperglucemia, hiperlipidemia, estrés oxidativo y procesos inflamatorios; implican una deficiencia de sistemas endógenos de defensa, así como de sus factores etiológico/patológico. La progresión de estos desórdenes puede disminuir o evitarse con la ingesta de compuestos bioactivos, como: polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas (Carmela y col., 2007; Kati y col., 2010). Estos compuestos son un grupo importante de metabolitos que se presentan en una gran diversidad de extractos de plantas que, en la mayoría de los casos, se reporta un valor terapéutico y que muestran una extrema diversidad tanto en número como en tipo y concentración. En el presente estudio se cuantificó la concentración de los compuestos fenólicos en extractos acuosos de diferentes selecciones de FPG (Cuadro 2). Aviram y col. (2008) en un estudio sobre el contenido de fenoles totales en un extracto acuoso de FPG (10 mg/mL) de la variedad Wonderful, encontraron una concentración de 166 mg eq. AG/g; similares concentraciones se obtuvieron en las selecciones en estudio, con un rango entre 96-203 mg eq. AG/g de flor seca. Con respecto al contenido de antocianinas totales no existen reportes previos para extractos de flor de granada; a excepción de Aviram y col. (2008) quienes reportan trazas de antocianinas. Sin embargo, en un análisis de los compuestos que constituyen la flor de granada se ha reportado la identificación de dos tipos de antocianinas (perlargonidina-3,5-diglucosido y la perlargonidina-3-glucosido) con un alto potencial antioxidante (Ali y col., 2006; Zhang y col., 2011). En un extracto acuoso de flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) cuyas características son similares a la flor de granada, se reportó que la concentración de antocianinas se encuentra entre 1.7-2.9 mg/g de flor seca (Galicia y col., 2008). En comparación con los resultados obtenidos en selecciones, se encontraron concentraciones similares, que van de 0.31 a 1.81 mg/g.

El papel fisiopatológico que desempeñan los compuestos fenólicos, como antioxidantes, es la prevención del daño de los constituyentes celulares, como consecuencia de reacciones químicas en las que se ven involucrados los radicales

libres. De aquí, la importancia de medir el potencial antioxidante de los extractos de FPG, ya que genera evidencia sobre su posible valor terapéutico contra enfermedades relacionadas con estrés oxidativo. La actividad antioxidante se realizó por el ensayo *in vitro* de ABTS, el cual mide la actividad de compuestos tanto lipofílicos como hidrofílicos para la captación del radical ABTS⁺. En el presente estudio se observa que el mayor potencial antioxidante *in vitro* lo presentan las selecciones 39-9, 34-1 y 39-7, así como la selección 38-2, lo cual se relaciona con su alta concentración de fenoles total. Estos resultados concuerdan con lo que mencionan Elfalleh y col. (2009) respecto al potencial antioxidante de la granada, el cual es independientemente del ensayo que se utilice y con una correlación entre la concentración de fenoles totales y su actividad antioxidante. De manera similar, María y col. (2010) mencionan que existe una correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, determinada por los ensayos de ABTS y DPPH, en el jugo o en la cáscara de granada. Dado lo anterior, se podría mencionar que la capacidad antioxidante *in vitro* que presenta cada una de las selecciones se debe a su contenido de fenoles totales. Adicionalmente, Zhang y col. (2011) concluyen en su estudio que las antocianinas presentes en la flor de granada contribuyen al alto potencial antioxidante que presenta la flor de granada. Tomando en cuenta estos criterios, se incluyeron para el estudio biológico subcrónico las selecciones 39-7 y 38-2.

La actividad biológica de los extractos acuosos de FPG se estudió en un modelo experimental de diabetes. Esta fue inducida con una dosis única administrada de STZ (50 mg/kg de peso corporal), lo cual contribuye a la destrucción de las células β del páncreas, ocasionando la decreciente secreción de insulina (Szkudelski, 2001), obteniéndose un modelo animal con diabetes tipo 1. En la Figura 5 se puede observar la elevación de los niveles de glucosa en sangre (>250 mg/dL) en el control diabético comparado contra el control sano, así como, un aumento gradual de este factor durante las tres semanas, lo que indica la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, los animales fueron sujetos a un

estudio experimental subcrónico, ya que el efecto antidiabético de la FPG se observa tras su administración por largos periodos, según lo mostrado por Bagri y col., (2009). En el presente estudio, sólo el grupo tratado con la selección 38-2 muestra un ligero efecto hipoglucémico, hasta la tercera semana de tratamiento. De acuerdo con Huang y col. (2005), el ácido gálico podría ser el responsable de la actividad hipoglucemiante mostrada por la flor de granada, ya que es uno de los compuestos más abundantes de la flor de granada. Por lo anterior, la actividad que presenta el grupo 39-7, comparada con el grupo 38-2 podría relacionarse específicamente con la composición del contenido de fenoles más que con la concentración total; ya que datos no publicados muestran que la concentración de ácido gálico en la selección 38-2 es mayor que la selección 39-7. Bagri y col. (2009) observaron que la administración oral de 250 mg/kg y 500 mg/kg de un extracto acuoso de flor de granada por 21 días produce un efecto hipoglucémico; sin embargo, esto lo observaron durante las tres semanas de tratamiento. La clara diferencia entre los dos experimento se debe al método de extracción, ya que en nuestro estudio el extracto acuoso administrado no fue previamente concentrado, por lo que la cantidad de compuestos bioactivos administrados es menor.

Así mismo, la decreciente producción de insulina ocasiona la movilización de grasa del tejido adiposo al torrente sanguíneo, ya que no se permite la incorporación de glucosa al tejido adiposo para la formación de glicerol-3-fosfato y la subsecuente reesterificación de los ácidos grasos para su almacenamiento en este tejido, por lo que aumenta la concentración de triglicéridos en torrente sanguíneo. Este factor puede constituir un riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Schwartz y col., 1992; Stamler y col., 1993). Por lo que valores superiores a 150 mg/dL de triglicéridos indican un riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. Con respecto a este parámetro, en nuestro estudio se observó que el grupo tratado con la selección 38-2 disminuyó sus niveles de triglicéridos, llegando a obtener valores similares ($P > 0.05$) al control sano; comportamiento que no se observa con el grupo 39-7. Esta disminución podría atribuirse a una menor síntesis de triglicéridos en el hígado.

Con respecto a los niveles de colesterol en sangre no se observó reducción significativa en ninguno de los dos tratamientos. Aunque no se registra un aumento en los niveles de HDL-C en los dos tratamientos, con respecto al control diabético, se observa una disminución significativa en el contenido de LDL-C en el grupo tratado con la selección 38-2. Estos dos últimos factores son importantes, ya que juegan un papel crucial en el transporte y metabolismo del colesterol. En la diabetes, generalmente se ven incrementados los valores de LDL-C y disminuidos los niveles de HDL-C lo cual puede ser un indicativo de problemas cardiovasculares (Goldstein y col., 2003), ya que las LDL-C en torrente sanguíneo son susceptibles de oxidación, iniciándose así el proceso aterogénico (Sánchez y col., 2001). Por lo anterior, la selección 38-2 protege posiblemente contra un proceso aterogénico.

Adicionalmente, la función renal se evaluó por medio de la medición de los niveles de microalbúmina y proteína en orina. La detección de microalbúmina en orina es un indicativo de la hiperfiltración glomerular, consecuencia de hiperglucemia e hiperlipidemia; y niveles de entre 30-300 mg de albúmina en orina por día es un indicativo de microalbuminuria. Se sabe que más del 80% de personas con diabetes tipo 1 y que presentan microalbuminuria, desarrollan nefropatía (Dronavalli y col., 2008). Adicionalmente, un estudio de Gambaro y col., (1992) en un modelo de diabetes tipo 1 con daño renal mostró 1.89 mg/24 h de albúmina en orina y el control sano de 0.36 mg/24 h. En el presente estudio, los animales experimentales diabéticos aumentaron sus niveles de albúmina en un 236.1% con respecto al control sano, por lo que se hace evidente la microalbuminuria. Con respecto a los tratamientos, sólo el grupo tratado con la selección 38-2 muestra una mejoría en este parámetro, disminuyendo en un 60.3%.

A pesar de que la microalbuminuria es considerada como un factor de riesgo que conlleva a macroalbuminuria, no todos los pacientes alcanzan tal estado y pueden regresar a niveles normales de albúmina (Caramori y col., 2000). Debido a

esto es necesaria la detección de proteinuria como índice de nefropatía diabética, ya que el estado de hiperglucemia en el tejido renal ocasiona el cambio de la permeabilidad en las células, permitiendo el paso de proteínas a la orina (Osawa y Kato, 2005). En el cuadro 4 se observa que el control diabético aumenta los niveles de proteína en orina hasta un 57.1% con respecto al control sano; adicionalmente, el grupo 38-2 muestra una disminución en los niveles de proteína en orina, lo cual indica la atenuación de una disfunción renal. Así mismo, se incluyó la medición del peso relativo del riñón ya que es un parámetro que indica un proceso de inflamación como consecuencia de las lesiones microvasculares ocasionadas por hiperglucemia e hiperlipidemia (Dronavalli y col., 2008). Sin embargo, este estudio sólo muestra una disminución en el peso relativo del riñón en el grupo tratado con la selección 38-2.

De acuerdo a lo mencionado hasta el momento, en relación al estudio *in vivo*, se podría mencionar lo siguiente: el efecto hipoglucémico que muestra el grupo tratado con la selección 38-2 puede estar relacionado a la inhibición de la α -glucosidasa e incremento en la sensibilidad de la insulina; adicionalmente, también se ha reportado que la administración de un extracto de flor de granada incrementa la expresión de PPAR- γ , favoreciendo el metabolismo de glucosa (Huang y col., 2005; Karaski y col., 2005). Estudios *in vitro* reportan que los compuestos fenólicos podrían participar en la estimulación de la insulina por las células β -pancreáticas (Ohno y col., 1993); de acuerdo con Huang y col., (2005) el ácido gálico presente en la flor de granada es el responsable de la activación de los mecanismos por el cual se atenúa la hiperglucemia. Por otra parte, la disminución de triglicéridos y LDL-C que se observa en el grupo tratado con la selección 38-2 podría estar relacionado con lo que mencionan Sarah y col. (2007) que extractos de flor de granada aumentan la expresión de ARNm de proteínas transportadoras de ácidos grasos al igual que la expresión de PPAR- α , el cual está involucrado en el metabolismo de lípidos; carnitina palmitato transferasa (CPT-1), que se involucra en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria; acil-Coenzima (CoA) oxidasa, involucrada en la β -oxidación; así mismo, también disminuyen la expresión

de ARNm de la proteína acetil-CoA carboxilasa, involucrada en la síntesis de *novo* de ácidos grasos. Adicionalmente, se sugiere que los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante pueden ejercer un importante efecto al disminuir los niveles de la citocina TNF- α (Amigó-Correig y col., 2008), la cual actúa inhibiendo la lipoproteína lipasa (LpL), aumentando de esta manera los niveles de colesterol y LDL-C en torrente sanguíneo (Grunfeld y Feingold, 1991). De esta forma, Huang y col. (2005) encontraron en un estudio *in vitro* que los componentes, como el ácido gálico, de la flor de granada aumentan la expresión de la LpL y por consecuencia se ven disminuidos los niveles de LDL-C en sangre. En relación al objetivo del presente estudio, los mecanismos por los cuales la flor de granada llega a inhibir la disfunción renal aún no han sido elucidados.

Por otra parte, la acción citotóxica de STZ está asociada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan un daño oxidativo a biomoléculas (Szkudelski, 2001). Adicionalmente, la elevación de los niveles de LDL-C provoca un daño microvascular debido a la oxidación de esta molécula, generando a su vez glomeruloesclerosis (Utpal y Suresh, 2010). En este sentido, el estrés oxidativo jugar un papel importante en el desarrollo de la nefropatía (Rao y Nammi, 2006). La atenuación del estrés oxidativo se puede llevar a cabo mediante la inhibición de ERO por antioxidantes exógenos o la activación de sistemas antioxidantes enzimáticos. Por lo que, la actividad citoprotectora de algunos compuestos antioxidantes puede ser evaluada mediante los niveles GSH, ya que se relaciona con la detoxificación celular, mediada por la reducción de peróxidos de hidrógeno (Baynes y Thorpe, 1996). En el presente estudio se observa (Cuadro 5) que los niveles de GSH y la actividad de GST en riñón aumentaron significativamente en los dos tratamientos, comparados contra el control diabético. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Bagri y col. (2009), quienes encontraron niveles altos de GSH y GST en páncreas de ratas diabéticas tratadas con un extracto acuoso de FPG. Adicionalmente, Gurpreet y col. (2006) encontraron una elevación de estos dos factores en ratones con hepatotoxicidad inducida con nitrilotriacetato ferrico (Fe-NTA) y tratados con FPG. Estos autores

sugieren que la elevación de estos factores indican una protección contra el estrés oxidativo inducido.

Otro mecanismo protector sobre riñón es la proteína PPAR- γ , como ya antes se ha descrito. En el presente estudio sólo se observa un ligero incremento en la expresión de la proteína PPAR- γ en tejido renal de los animales tratados con la selección 38-2. Recientemente se ha reportado que los ligandos de PPAR- γ reducen la albúmina en orina en pacientes diabéticos tipo 2 con nefropatía y en modelos animales de diabetes tipo 2 (Yang y col., 2009), aunque el mecanismo no se tiene bien esclarecido. Por lo que, la disminución de microalbúmina en orina del grupo tratado con la selección 38-2 puede deberse, en parte, al ligero aumento de la expresión de PPAR- γ . Huang y col. (2005) mencionan que la activación de PPAR- γ se atribuye al contenido de ácido gálico en la flor de granada.

Otro marcador importante que indica daño renal y que define un proceso inflamatorio, es la molécula de adhesión vascular VCAM-1, la cual aumenta su expresión cuando se presentan procesos inflamatorios (Alpers y col., 1993). La Figura 7 muestra que la expresión de VCAM-1 es menor en el grupo tratado con la selección 38-2 que la del control diabético, obteniendo así un efecto antiinflamatorio en dicho grupo. Como ya se mencionó, la expresión de esta molécula está mediada por el factor NF- κ B; a su vez PPAR- γ regula su translocación al núcleo, lo que por consecuencia induce la disminución de VCAM-1 (Utpal y Suresh, 2010); sin embargo, en nuestro estudio la disminución de la expresión de VCAM-1 probablemente sea independiente de la expresión de PPAR- γ .

VIII CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que existe una relación entre el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante *In vitro* en todas las selecciones de flor de granada; aunque, no se observa una relación entre el contenido de antocianinas y capacidad antioxidante. Adicionalmente, el grupo tratado con la selección 38-2 mostró el mayor efecto antidiabético, al disminuir los niveles de glucosa en sangre, triglicéridos y LDL-C; lo cual se relaciona con la protección contra daño renal; aunque este efecto no se podría relacionar con los niveles de GSH y GST, ya que ambos tratamientos mejoraron estos marcadores. Por otra parte no existe una relación entre la expresión de PPAR- γ y la expresión de VCAM-1; sin embargo, la disminución de VCAM-1 indica protección contra daño renal. Por lo que, el extracto acuoso de flores secas de granada de la selección 38-2 protege contra daño renal.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Aal, E.S.M. y Hucl, P.A. **1999**. Rapid method for quantify in total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry Journal*. Vol. 76: 350-354.

Ali, M. y Sharma, N. **2006**. phytochemical investigation of the flowers of *Punica granatum*. *Indian Journal of Chemistry*. Vol. 45: 1681-1685.

Amigó-Correig, P., Bulló, M., Márquez-Sandoval, F., Vizmanos-Lamotte, B., Alegret, C. y Salas-Salvadó, J. **2008**. Importancia de la dieta en la inflamación. *Antropología*. Vol. 16: 23-28.

Alpers, C.E., Hudklns, K.L., Davis, C.L., Marsh, C.L., Riches, W., Mccarty, J.M., Benjamin, C.D., Carlos, T.M., Harlan, J.M. y Lobb R. **1993**. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in kidney allograft rejection. *Kidney International*. Vol. 44: 805-816

Arts, M., Haenen, G., Voss, H.P. y Bast, A. **2003**. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 42: 45-49.

Aviram, M. Volkova, N. Coleman, R. Dreher, M. Kesava-Reddy, M. Ferreira, D. y Rosenblat, M. **2008**. Pomegranate Phenolics from the Peels, Arils, and Flowers Are Antiatherogenic: Studies *in Vivo* in Atherosclerotic Apolipoprotein E-Deficient (E0) Mice and *in Vitro* in Cultured Macrophages and Lipoproteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56: 1148-1157.

Caramori, M. L., Fioretto, P. y Mauer, M. **2000**. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes*. Vol. 49: 1399–1408.

Bagri, P., Ali, M., Aeri, V., Bhowmik, M. y Sultana, S. **2009**. Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 47: 50–54.

Baynes, J.W. **1991**. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. Vol. 40: 405-412.

- Baynes, J.W.** y Thorpe S.R. **1999**. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications. *Diabetes*. Vol. 48.
- Brownlee, M.** **2001**. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. Vol. 414: 813-320.
- Carmela, S.,** Rosaria, V., Beatrice, S., Roberta, D.B., Carmela, F. y Roberta. M. **2007**. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità*. Vol. 43: 394-405.
- Chung, S.M.S.,** Ho, E.C.M., Lam, K.S.L. y Chung, S.K. **2003**. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal American Society Nephrology*. Vol. 14: 233-236.
- Danesh, J.,** Collins. R., Appleby, P. y Peto, R.,. **1998**. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *Journal of the American Medicinal Association* . Vol. 279: 1477-1482.
- Dronavalli, S.,** Duka, I. y Bakris G.L. **2008**. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*. Vol. 4: 444-452
- Elfalleh, W.,** Nasri, N., Marzougui, N., Thabti, I., M'Rabet, A., Yahya, Y., Lachiheb, B., Guasmi, F. y Ferchichi, A. **2009**. Physico.chemical properties and ABTS-DPPH scavenging activity of some local pomegranate (*Punica granatum*) ecotypes. *International Journal of Food Sciences of Nutrition*. Vol. 60: 925-938.
- Ellman, G.** **1959**. Tissue sulfhydryl groups . *Archives of Biochemistry Biophysics*. Vol. 82: 70-79.
- Esposito, K.,** Nappo, F., Marfella, R., Giugliano, G., Giugliano, F., Ciotola, M., Quagliaro, L., Ceriello, A., y Giugliano, D. **2002**. Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans: Role of Oxidative Stress. *Circulation*. Vol. 106: 2067-2072.
- Evans, J.L.,** Goldfine, I.D., Maddux, B.A. y Grodsky, G.M. **2002**. Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*. Vol. 23: 599–622.

- Fan, Y., Wang, Y., Tang, Z., Zhang, H., Qin, X., Zhu, Y., Guan, Y., Wang, X., Staels, B., Chien, S. y Wang, N. 2008.** Suppression of proinflammatory adhesion molecules by PPAR- δ in human vascular endothelial cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 28: 315–321.
- Faria, A., Monteiro, R., Azevedo, I. y Calhau, C. 2007.** Pomegranate juice effects on cytochrome P450S expression: in vivo studies. *Journal of Medicinal Food*. Vol. 10: 643-649.
- Francis, G.A., Annicotte J.S. y Auwerx, J. 2003.** PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 3: 186-191.
- Galicia, F.L., Salinas, M.Y., Espinoza, G.B. y Sanchez, F.C. 2008.** Physicochemical characterization and antioxidant activity of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.) national and imported. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. Vol. 14: 121-129
- Gambaro, G., Cavazzana, A., Luzi, P., Piccoli, A., Borsatti, A., Crepaldi, G., Marchi, E., Venturini, A.P. y Baggio B. 1992.** Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats. *Kidney international*. Vol. 42: 285-291.
- Gilde, A.J. y Van-Bilsen, M. 2003.** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinava*. Vol. 178: 425-434.
- Giugliano, D., Ceriello, A. y Paolisso, G. 1996.** Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. Vol. 19: 257-267.
- Goldstein, B.J., Müller D. y Dunitz, M. 2003.** Textbook of Type 2 Diabetes E.U.A. 343-355.
- Gómez-Fernández, P., Ruiz A., Conde M., Campos R., Vargas J.C. y Almaraz M. 2004.** Marcadores de inflamación vascular en la diabetes mellitus tipo 2 con hipertensión arterial y albuminuria. *Nefrología*. Vol. 24: 2-29.
- González-Maqueda, I. 2007.** La enfermedad coronaria del diabético. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento. *Revista Española de Cardiología*. Vol. 7: 29-41.
- Gurpreet, K., Zoobi, J., Mohammad, A. y Sarwar, A. 2006.** *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates

Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 44: 984-939.

Gutiérrez, Y.I., Miranda, M., Varona, N. y Rodríguez A.T. **2000**. Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajava* (L). *Revista Cubana Farmacia*. Vol. 34: 50-55.

Gutteridge, J.M. y Halliwell, B. **2000**. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academic of Sciences*. Vol. 899: 136-47.

Grunfeld, C. y Feingols, K.R. **1991**. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy*. Vol. 3: 143-158.

Ha, H., Hwang, I.A., Park, J.H. y Lee, H.B. **2008**. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*. Vol. 13: 42-45.

Habig, W.H., Pabst, M.J. y Jakoby, W.B. **1974**. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249: 7130-7139.

Huang, T.H., Peng, G., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J., Roufogalis, D.B. y Li Y. **2005**. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR- γ and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 207: 160–169.

Huebschmann, A.G., Regensteiner, J.G., Vlassara, H. y Reusch, J.E. **2006**. Diabetes and advanced glycooxidation end products. *Diabetes Care*. Vol. 29: 1420-1432.

Kanitkar, M., Gokhale, K., Galande, S. y Bhonde, R.R. **2008**. Novel role of curcumin in the prevention of cytokine-induced islet death *in vitro* and diabetogenesis *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 155: 702–713..

Karasik, A. **2005**. Glycaemic control is essential for effective cardiovascular risk reduction across the type 2 diabetes continuum. *Annals of Medicine*. Vol. 37: 250–258.

Kati, H., Riitta, T., Isabel, B.P., Jenna, P., Marjukka, K., Hannu, M. y Kaisa P. 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 11: 1365-1402.

Kolm, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R. y Schleicher, E.D. 1998. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 101: 160-169.

Li, Y., Wen, S., Kota, B.P., Li, G.Q., Yamahara, J. y Roufogalis B.D. 2005. *Punica granatum* flower extract, a potent alpha-glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal Ethnopharmacol*. Vol. 99: 239–244.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin's reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 193: 265–275.

Maria, G.M., Maria, A.N. y Maria D.A. 2010. Pomegrante (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties –A short review. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 4: 2839-2847.

May, M.J. y Ghosh, S. 1997. Rel/NFkappa B and I kappa B proteins: An overview. *Seminars in Cancer Biology*. 8: 63–73.

McClain, D.A., y Crook, E.D. 1996. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes*. Vol. 45:1003-1009.

Navarro, J. 2003. Nefropatía diabética: ¿una cuestión de inflamación? Hipótesis del daño renal inflamatorio en la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología*. Vol. 23: 381-389.

Ohno, T., Kato, N., Ishii, C., Shimizu, M., Ito, Y., Tomono, S., Kawazu, S. 1993. Genistein Augments Cyclic Adenosine 3,5-Monophosphate (cAMP) Accumulation and Insulin Release in Min6 Cells. *Endocrine Research*. Vol. 19: 273-285.

Osaw, T y Kato, Y, 2005. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Annals of the New York Academic of Sciences*. Vol. 1043: 440-451.

Palma, G.J. 2007. La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Revista Española de Cardiología*. Vol. 7: 12-19.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P. y Kensler, T.W. 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA*. Vol. 98: 3410-3415.

Ridker, P.M., Glynn, R.J. y Hennekens, C.H. 1998. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*. Vol. 97: 2007-2011.

Rijks, L.G. 1995. Friedewald formula. *Clinical Chemistry*. Vol. 41: 761.

Rao, N.K. y Nammi, S. 2006. Antidiabetic and renoprotective effects of the chloroform extract of *Terminalia chebula* Retz. seed in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 6: 17-22.

Saito, I., Folsom, A.R., Brancati, F.L., Duncan, B.B., Chambless, L.E. y McGovern, P.G. 2000. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Annals of Internal Medicine*. Vol. 133: 81-91.

Sánchez, R.A. y Kaski, J.C. 2001. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura, *Revista Española de Cardiología*. Vol. 54: 751-763.

Sarah, R.K., Robert, A.N. y Ephraim, P.L. 2007. *Punica granatum*: heuristic treatment for diabetes mellitus. *Journal of Medicinal Food*. Vol. 10: 213–217.

Schinner, S., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R. y Barthel, A. 2005. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance. *Diabetic Medicine*. Vol. 22: 674-682.

Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P. y Porte, D. 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*. Vol. 130: 3608-3616.

Siivarajan, V.V. y Indira, B. 1994. *Ayurvedic drugs and their Plant Sources*. 315.

Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Reventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Vol. 299: 152-178.

Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J.D. y Wentworth, D. 1993. Diabetes, other risk factors, and 12 year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. Vol. 16: 434-44.

Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*. Vol. 50: 536-546.

Tan, A.L.Y., Forbes, J.M. y Cooper, M.E. 2007. AGE, RAGE and ROS in diabetic nephropathy. *Seminars in Nephrology*. Vol. 27: 130-143.

Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M. y Amir, R. 2007. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55: 9559-9570.

The Expert Committee. 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Vol. 26: 5-20.

Utpal, S. y Suresh C.T. 2010. Homocysteine and hypertension in diabetes: Does PPAR- γ have a regulatory role ?. Hindawi Publishing Corporation. Vol. 2010: 1-12.

Vit, P. y Coroa, G.M. 2004. *Punica granatum* L. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 9 Granada. *Revista de la facultad de farmacia de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela*. Vol. 46: 41-43.

Wang, R., Ding, Y., Liu R., Xiang L. y Du L. 2010. Pomegranate: constituents, Bioactivities and Pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable and Cereal science and biotechnology*. Vol. 4: 77-87.

Warrier, P.K., Nambiar, V.P.K. y Ramankutty, C. 1995. *Indian Medicinal Plants*. Vol. 1-5. Orient Longman Ltd., Madras.

Wolf, G., Chen, S., Han, D.C. y Ziyadeh, F.N. 2002. Leptin and renal disease. *American Journal of Kidney Disease*. Vol. 39:1-11.

Yang, J, Zhang D., Li, J., Zhang, X., Fan, F. and Guan, Y. 2009. Role of PPARgamma in renoprotection in Type 2 diabetes: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Sciences (Lond)*. Vol. 116: 17-26.

Zhang, L., Fu, Q. and Zhang, Y. 2011. Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry*. Vol. 127: 1444–1449.

Zárate, A. and Hernández V.M. 2007. Conocimientos generales sobre diabetes: acerca de su prevención y manejo. *Acta Medica Grupo Ángeles*. Vol. 5: 2.