

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA



DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la fitoquímica y de la actividad
nefroprotectora del extracto acuoso de
Eryngium alternatum para determinar su uso
terapéutico

Para la obtención del título de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LBM. Carlos Guillermo Valderrábano Roldán

Director:

Dra. Zaida Nelly Juárez

Directores externos:

Dra. Rosemary Wangenstein Fuentes

Dr. Luis Ricardo Hernández

Asesor:

Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez

Puebla, México

27 de junio de 2020



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Se aprueba la Tesis:

Evaluación de la fitoquímica y de la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* para determinar su uso terapéutico

Nombre del Alumno

Carlos Guillermo Valderrábano Roldán

Comité Asesor

Dra. Zaida Nelly Juárez

Directora de Tesis

Dr. Luis Ricardo Hernández

Co-Director

Dra. Elizabeth Bautista Rodríguez

Asesora

Puebla, México.

3 de Julio de 2020

Puebla, Pue. 3 de Julio 2020

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Directora del Programa de Maestría en Biotecnología

Asunto: Revisión de plagio para proyecto de grado

Estimada Doctora Beatriz Pérez Armendáriz

Antes que nada, reciba un cordial saludo y nuestro apoyo y compromiso de colaboración con los requerimientos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para las actividades de aseguramiento de la calidad y consolidación del posgrado.

Derivado del proceso de revisión de la herramienta de Antiplagio SafeAssign se detectaron los siguientes hallazgos:

Coincidencia Promedio: 11%

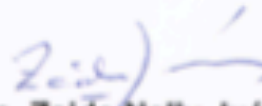
Coincidencia Máxima: 11%

Por lo anterior se vislumbra un riesgo BAJO en el análisis del documento para la obtención del grado del alumno:

Carlos Guillermo Valderrábano Roldán

Se anexa reporte del informe de la herramienta.

Atentamente



Dra. Zaida Nelly Juárez
Director de Tesis

Originality Report de SafeAssign

SafeAssign Originality Report

 Report Summary Low risk

These papers include some quotes and few common phrases or blocks of text that match other documents. These papers typically do not require further analysis, as there is no evidence of plagiarism.

Overall Text Similarity

Average Match

11 %

Highest Match

11 %

Vanderbloem, Kristin, Carrozzini, Text E. et al.

Originality Reports (1)



Attachment 1

Vanderbloem, Kristin, Carrozzini, Text E. et al.

11 %

Este trabajo fue realizado con financiamiento de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP)

Agradecimientos personales

Quiero agradecer a las personas que considero más han aportado en mi formación profesional, que son la Dra. Zaida Nelly Juárez; a quien considero más que una tutora, o como ella dice, mi madre académica y la Dra. Rosemary Wangenstein Fuentes; quién fue un pilar muy sólido durante mi camino por la maestría, sin la orientación y conocimiento de ambas, pero sobre todo su paciencia; no hubiese podido consolidar el trabajo que ahora presento.

Además, quiero resaltar la aportación invaluable del personal que labora en la universidad, así como a los miembros del laboratorio que con sus consejos mejoraron de una manera significativa mi aprendizaje y el proceso experimental empleado en este proyecto. Así mismo, quiero agradecer al Dr. Francisco O'Valle del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Granada por su colaboración en el análisis histopatológico. Y al Dr. Ricardo Hernández de la Universidad de las Américas Puebla por apoyarme en mi formación durante el posgrado. Finalmente quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera me hicieron un mejor individuo y profesional.

Índice

Resumen	11
Abstract.....	12
1. Introducción	13
2. Antecedentes	14
2.1 Enfermedad renal crónica.....	14
2.1.1 Definición	14
2.1.2 Clasificación de la enfermedad renal crónica	15
2.1.4 Diagnóstico de la enfermedad renal crónica	17
2.1.4.1 Proteinuria.....	17
2.1.4.2 Microalbuminuria.....	18
2.1.4.3 Alteraciones en el sedimento urinario	18
2.1.4.4 Evaluación de la función renal.....	19
2.1.4.5 Medición de la tasa de filtrado glomerular.....	19
2.2 Nefropatía.....	22
2.3 Aminopeptidasas como biomarcadores tempranos de daño renal	23
2.4 Modelo animal de daño renal provocado por la ingesta de fructosa	25
2.5 La medicina tradicional.....	26
2.5.1 El género <i>Eryngium</i>	27
2.5.2 Aplicaciones del género <i>Eryngium</i>	28
2.5.3 <i>Eryngium alternatum</i> como alternativa en la enfermedad renal.....	29
2.6 Extractos vegetales	31
2.6.1 Métodos de extracción empleados en plantas medicinales	31
2.6.2 Tipos de extracción.....	31
2.6.3 Principios activos.....	32
2.6.3.1 Metabolitos primarios y secundarios	33
2.6.3.2 Metabolitos secundarios	34
2.7 Modelos <i>In vivo</i>	37
2.7.1 Modelo de <i>Artemia</i> spp.	37
2.7.1.1 Morfología	37
2.7.1.2 Ciclo de vida	38
2.7.1.3 Ensayo de letalidad	39
2.7.2 Modelo de daño renal en ratas con síndrome metabólico	41

2.8 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto	42
3. Justificación	44
4. Objetivos	45
4.1 Objetivo general	45
4.2 Objetivos específicos.....	45
5. Materiales y métodos	46
5.1 Recolección del material vegetal	46
5.2 Obtención del extracto acuoso	46
5.3 Ensayo de letalidad del extracto acuoso en el modelo de <i>Artemia</i> spp.	46
5.4 Evaluación de la actividad antioxidante.....	47
5.5 Evaluación de la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de	48
<i>Eryngium alternatum</i> en ratas tratadas con fructosa	48
5.5.1 Evolución de peso	49
5.5.2 Ingesta de bebida y fructosa	49
5.5.3 Variables morfológicas	49
5.5.4 Análisis de parámetros bioquímicos	50
5.5.4.1 Urea, creatinina y glucosa plasmáticas	50
5.5.4.2 Actividad aminopeptidásica (GluAp y AlaAp) en plasma	50
5.5.4.3 Parámetros urinarios	51
5.5.4.4 Aclaramiento de creatinina.....	52
5.5.4.5 Correlación entre marcadores urinarios y creatinina	52
5.5.4.6 Correlación entre marcadores urinarios y aclaramiento de creatinina.....	52
5.6 Histopatología.....	53
6. Resultados y discusión	54
6.1 Colecta del material vegetal	54
6.2 Obtención del extracto acuoso	54
6.3 Ensayo de letalidad del extracto en el modelo de <i>Artemia</i> spp.	55
6.4 Evaluación de la actividad antioxidante.....	56
6.5 Evaluación de la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de <i>Eryngium</i> <i>alternatum</i> en ratas tratadas con fructosa	57
6.5.1 Evolución de peso	57
6.5.2 Ingesta de bebida y fructosa	58
6.5.3 Variables morfológicas	59

6.5.4 Análisis de parámetros bioquímicos	60
6.5.4.1 Urea, creatinina y glucosa plasmáticas	60
6.5.4.2 Actividad aminopeptidásica (GluAp y AlaAp) en plasma	62
6.5.4.3 Parámetros urinarios	63
6.5.4.4 Aclaramiento de creatinina.....	65
6.5.4.5 Correlación entre marcadores urinarios y creatinina	66
6.5.4.6 Correlación entre marcadores urinarios y aclaramiento de creatinina.....	67
6.6 Histopatología.....	68
7. Conclusiones	70
8. Recomendaciones.....	72
9. Referencias.....	73
10. Anexos.....	90

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) forma parte de las enfermedades no transmisibles (ENT) que afectan a gran parte de la población mundial (OMS, 2018). Su incidencia aumenta todos los años y su principal agente causal es el síndrome metabólico (Kearney *et al.*, 2005; Irigoyen Coria *et al.*, 2017). En este trabajo se determinó la utilidad nefroprotectora del extracto acuoso de *Eryngium alternatum*, se realizaron pruebas *in vitro* donde se evidenció la pobre actividad antioxidante del extracto, además, resultó moderadamente tóxico en el modelo de *Artemia* spp. presentando una CL₅₀ de 481 ppm. Finalmente, se realizaron pruebas *in vivo* utilizando un modelo animal de daño renal para valorar los efectos del extracto a nivel sistémico, dando como resultado una disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG), incremento de la actividad enzimática de GluAp y AlaAp en muestras de orina, así como un incremento en la concentración plasmática de urea y creatinina, todo lo anterior se corroboró mediante estudios histopatológicos donde se observó necrosis tubular localizada y descamación de células tubulares. Por los resultados obtenidos se puede concluir que el extracto acuoso de *Eryngium alternatum* no desempeña una función nefroprotectora.

Palabras clave: Enfermedad renal crónica, síndrome metabólico, *Eryngium alternatum*, extracto acuoso, aminopeptidasas.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is one of the non-transmissible diseases (NTD) that affect a big part of world population (WHO, 2018). Its incidence increases every year and main causal agent is metabolic syndrome (Kearney et al., 2005; Irigoyen Coria et al., 2017). In this work, nephroprotective utility of aqueous extract of *Eryngium alternatum* was determined, *in vitro* tests were carried out where the poor antioxidant activity of the extract was evidenced, in addition, it was moderately toxic in *Artemia* spp. model presenting a LC_{50} of 481 ppm. Finally, *in vivo* tests were performed using an animal model of kidney damage to evaluate the effects of aqueous extract at systemic level, resulting in a decrease in the glomerular filtration rate (GFR), increased enzymatic activity of GluAp and AlaAp in urine samples, as well as an increase in plasma concentration of urea and creatinine, all above was corroborated by histopathological studies where localized tubular necrosis and tubular cell sloughing were found. Due results obtained it can be concluded that aqueous extract of *Eryngium alternatum* does not play a nephroprotective role.

Keywords: Chronic kidney disease, metabolic syndrome, *Eryngium alternatum*, aqueous extract, aminopeptidases.

1. Introducción

Podemos definir a la enfermedad renal crónica (ERC) como un conglomerado de anormalidades que tienen que ver con la estructura o función del riñón y que además están presentes por un lapso de tiempo de al menos 3 meses (Martínez *et al.*, 2016). Dentro de los métodos de diagnóstico se encuentran los estudios para determinar la presencia de proteína y glóbulos rojos en orina (proteinuria y hematuria respectivamente), así como los estudios séricos para la determinación de urea y creatinina (Thomas *et al.*, 2008; Martínez-Castelao *et al.*, 2015). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes en la metodología actual yace en el diagnóstico tardío, ya que dichos procedimientos son capaces de detectar a la enfermedad renal crónica (ERC) en sus etapas avanzadas (etapas 3-5), es decir, cuando la tasa de filtrado glomerular (TFG) está severamente reducida, por lo que resulta evidente y sintomático el proceso de la enfermedad (Bonventre *et al.*, 2010; Quesada *et al.*, 2017; Márquez *et al.*, 2018; AL-Naimi *et al.*, 2019).

De acuerdo con datos de la “Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO)”, México es un país rico en plantas medicinales, por lo que la recolección y uso de las mismas resulta accesible, además, sus propiedades ejercen acción sistémica sobre el organismo (Mejía *et al.*, 2017) y dichos efectos son duraderos en comparación con la medicina alópata (Ringuelet & Viña, 2013), incluso, no son excluyentes con los medicamentos convencionales, y en la mayoría de los casos, sirven como adyuvantes para mejorar los resultados de un tratamiento convencional (Porras & Álvarez, 2013).

Diversos estudios han atribuido efectos terapéuticos al género *Eryngium*, dentro de los cuales destacan su actividad antimicrobiana (Thiem *et al.*, 2010), antiveneno (Price *et al.*, 2016) y antioxidante (Darriet *et al.*, 2014). Sobre la misma línea, y a través de referencias populares; fue que se contempló a *Eryngium alternatum* como una especie con potencial utilidad contra la ERC, aunado a que es un ejemplar poco estudiado y que por su abundancia en las regiones templadas del país se pueden validar sus propiedades nefroprotectoras a través de estudios *in vitro* e *in vivo*.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad renal crónica

De acuerdo con datos proporcionados por la “Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2018 ocurrieron 41 millones de muertes cuya etiología se remonta a las enfermedades no transmisibles (ENT) que equivalen al 71% de los decesos en el planeta”. Las ENT tienden a ser padecimientos de varios meses e incluso años, y son el resultado de diversos factores dentro de los que destacan el estilo de vida, factores ambientales, conductuales, genéticos y fisiológicos (OMS, 2018).

Las ENT son un conjunto de enfermedades que afectan a todos los países y a todas las personas sin distinción de edad, sin embargo, se ha reportado una incidencia significativa en los sectores poblacionales cuya edad es avanzada. Dentro de ese extenso grupo de enfermedades que componen a las ENT yace la enfermedad renal crónica o ERC (Tsai *et al.*, 2016). La ERC ha sido reconocida por diversas organizaciones internacionales como un problema de salud pública debido a su magnitud epidemiológica, así mismo por la serie de complicaciones clínicas que se producen durante su desarrollo (Márquez *et al.*, 2018). Debido a la ausencia de un diagnóstico temprano de la enfermedad se han generado consecuencias económicas pero sobre todo en la salud del individuo en cuestión. Esta enfermedad está catalogada por ser un padecimiento silencioso ya que la sintomatología se manifiesta, en la mayoría de los casos, cuando la función renal está gravemente disminuida (Quiroga *et al.*, 2015; Márquez *et al.*, 2018).

2.1.1 Definición

La ERC está definida como la “disminución progresiva, permanente e irreversible de la tasa de filtrado glomerular ($\text{TFG} < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ [Superficie corporal])”, esta disminución del filtrado glomerular está acompañado de la presencia de daño renal durante al menos 3 meses, (Levey *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2016).

Una $\text{TFG} < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, de acuerdo con estudios de histopatología, implica la pérdida de al menos la mitad de la función renal, aunado al cuadro clínico característico de la ERC, si la TFG es $> 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, el diagnóstico para determinar a la enfermedad

se establece mediante análisis de laboratorio que puedan poner en evidencia la presencia de daño renal, en términos generales, suelen ser de dos tipos, los primeros pertenecen a los estudios directos y corresponden a alteraciones propias del tejido renal determinadas a través de una biopsia, y los segundos, que corresponden a los diagnósticos indirectos (a través de biomarcadores) como pueden ser las alteraciones urinarias (albuminuria, microhematuria), alteraciones plasmáticas y anomalías estructurales a través de estudios de imagen (Thomas *et al.*, 2008).

2.1.2 Clasificación de la enfermedad renal crónica

En el año 2002, la Fundación Nacional del Riñón a través de la “Iniciativa para la Calidad de Resultados en la Insuficiencia Renal (K/DOQI)” propuso una compilación para establecer los estadios por los que cursa la ERC, esta clasificación ha sido un punto de referencia a escala global (Levey *et al.*, 2002, National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2008; Webster *et al.*, 2017). La clasificación subdivide a la enfermedad en 5 etapas, y están en función de la TFG (Tabla 1). La guía K/DOQI tiene como principal objetivo la prevención de las complicaciones clínicas, además del manejo terapéutico pertinente de acuerdo con cada estadio de la enfermedad.

Estadios de la ERC según las guías K/DOQI 2002 de la National Kidney Foundation		
Etapa	Descripción	TFG (ml/min/1.73 m ² de superficie corporal)
-	Factores de riesgo*	>60 (sin daño renal)
1	TFG normal con daño renal †	>90
2	TFG ligeramente reducida con daño renal †	60-89
3	TFG moderadamente reducida	30-59
4	TFG severamente reducida	15-29
5	Falla renal terminal	<15 o diálisis

Tabla 1. Clasificación de la ERC en función de la guía K/DOKI 2002 de la National Kidney Foundation.

*Factores de riesgo: Tensión arterial elevada, diabetes, antecedentes familiares con ERC, edad avanzada, infecciones urinarias, fármacos nefrotóxicos, litiasis y enfermedades sistémicas y autoinmunes

† Daño renal: Alteraciones patológicas y diagnóstico indirecto (biomarcadores), fundamentalmente proteinuria/albuminuria (albúmina/creatinina >30 mg/g); otras metodologías que se pueden considerar son las irregularidades en el sedimento urinario y/o anomalías detectadas con estudios de imagenología.

2.1.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo de la ERC pueden estar definidos por una condición no modificable o bien pueden desarrollarse a lo largo de la vida y pueden ser modificables (Levey *et al.*, 2002). Los factores de riesgo se pueden clasificar en tres grupos, el primero corresponde a los factores de susceptibilidad como la edad, antecedentes clínicos familiares con ERC e incluso la condición racial. El segundo grupo corresponde a los factores de iniciación, donde las enfermedades crónicas e infecciones tienen un rol determinante. Por último, los factores de progresión, que suelen empeorar el problema y declinar con mayor rapidez la función renal (Tabla 2), (Tejedor, 2008; Flores *et al.*, 2009; Martínez-Castelao *et al.*, 2015).

Factores de riesgo de la Enfermedad Renal Crónica		
Factor	Concepto	Ejemplos
De susceptibilidad	Incrementa la probabilidad de padecer un daño renal	Antecedentes familiares con ERC Bajo peso al nacimiento Vejez y senectud Masa renal disminuida Transplantes Raza negra Pobreza económica Tensión arterial elevada
De iniciación	Son responsables de causar el daño (Inician directamente el daño)	Diabetes Enfermedades autoinmunes Infecciones a nivel sistémico Tensión arterial elevada Afecciones y obstrucciones del tracto urinario Uso de drogas y fármacos (AINES) Litiasis urinaria
De progresión	Generan un empeoramiento del daño renal y declinan con mayor rapidez la función renal	Proteinuria Anemia Diabetes Hipercalcemia Tensión arterial elevada Obesidad Tabaquismo

Tabla 2. Factores de riesgo de la ERC. La prevalencia de la enfermedad incrementa conforme la población envejece, otros factores fuertemente relacionados con el padecimiento de la ERC son la diabetes mellitus, tensión arterial elevada y los problemas asociados al peso (obesidad y anemia). Algunos factores como la tensión arterial elevada y la diabetes mellitus pueden presentarse de forma simultánea como factores de susceptibilidad, iniciadores y de progresión.

2.1.4 Diagnóstico de la enfermedad renal crónica

En términos generales, se recomienda que los individuos que presenten uno o más factores de riesgo acudan a la realización de análisis de laboratorio para comprobar la presencia de daño renal y valorar la TFG. Las pruebas que se recomiendan son el examen general de orina (determinación de glucosa y proteínas), el análisis de sedimento urinario y los estudios en sangre para determinar la creatinina en plasma; partiendo de ese valor se podrá calcular la TFG (Martínez-Pérez *et al.*, 2016; Irigoyen *et al.*, 2017), existen otras pruebas diagnósticas como la determinación de electrolitos (sodio, potasio, cloruros y bicarbonato), pruebas de densidad, pH urinarios y osmolaridad (Campos-Gutiérrez *et al.*, 2011), así como estudios de histopatología e imagen (Martínez-Pérez *et al.*, 2016).

2.1.4.1 Proteinuria

Incluso en un estado fisiológico óptimo, se excretan pequeñas cantidades de proteínas (≈ 100 mg/ 24 h). Las proteínas a determinar en un estudio de orina son la “albúmina (40%), globulinas de bajo peso molecular (20%) y proteínas de origen tubular y del tracto urinario (40%)”, (Poortmans & Jeanloz, 1968; Martínez-Castelao *et al.*, 2014). Cuando la excreción de proteínas supera los 150 mg/ 24 h se habla de estado de proteinuria (Robinson, 1980; Webser *et al.*, 2017) y es indicativo de enfermedad renal y/o progresión de una nefropatía (Grim *et al.*, 1997). Es importante la realización de un buen sondeo del paciente ya que se pueden reportar falsos positivos generados por el diagnóstico de proteinuria intermitente o transitoria como es el caso de las dietas cuyo contenido de proteínas es elevado, el ejercicio intenso, cuadros febriles, embarazo e insuficiencia cardiaca.

Para la determinación de proteinuria se disponen de métodos cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos (Webser *et al.*, 2017). Dentro de los semicuantitativos yacen las tiras reactivas con un indicador colorimétrico de tetrabromofenol, el cual reacciona cuando se unen las proteínas de la orina, es altamente específico, sin embargo, posee poca sensibilidad ya que solo detecta albúmina en concentraciones mayores a 300-500 mg/ 24 h (30 mg/dl), por lo tanto, no se puede determinar la presencia

de microalbuminuria o proteínas que no sean albúmina. El método más empleado es la cuantificación de proteína urinaria durante un periodo de 24 h (Flores *et al.*, 2009). Un rango fisiológico normal debe ser <150 mg/24 h (Tabla 3).

Definición de proteinuria y albuminuria		
Categoría	Valor (mg/24h)	Valor (mg/g creatinina)
Excreción de proteína		PC
Normal	<150	<200
Proteinuria	>150	>200
Proteinuria nefrótica	>3.500	>3.500
Excreción de albúmina		CAC
Normal	<30	<30
Microalbuminuria	30-300	30-300
Macroalbuminuria	>300	>300

Tabla 3. PC: cociente proteína-creatinina, CAC: cociente albúmina-creatinina.

2.1.4.2 Microalbuminuria

La microalbuminuria está definida como “el incremento en la excreción urinaria de albúmina que es superior al rango fisiológico normal y que simultáneamente está por debajo del umbral de detección de albuminuria”, es decir, que la concentración de albúmina se encuentra entre 30 y 300 mg/ 24 h (Tsai *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 2017).

2.1.4.3 Alteraciones en el sedimento urinario

Microhematuria

La microhematuria está considerada como el hallazgo de glóbulos rojos superior a 3 células por campo microscópico en el sedimento urinario en dos muestras urinarias que han sido captadas de forma correcta (Grossfeld *et al.*, 2001). De acuerdo con la etiología de las microhematurias, podrán ser de origen glomerular o no-glomerular. Cuando es glomerular suelen estar acompañadas de proteínas, tensión arterial elevada, edema e

insuficiencia renal. En estos casos se recomienda la detección de cilindros hemáticos en la muestra, así como dimorfismos de los glóbulos rojos mediante microscopía de fases (Moreno *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 2017). Cuando la etiología es no-glomerular se recomienda la implementación de estudios de imagen del tracto urinario superior (escáner helicoidal, ecotomografía y pielografía intravenosa) para descartar el desarrollo de neoplasias del tracto urinario y del parénquima renal, así como la presencia de quistes, cálculos renales y lesiones obstructivas del tracto urinario (Flores *et al.*, 2019; Moreno *et al.*, 2016).

2.1.4.4 Evaluación de la función renal

La TFG está definida como “el volumen de plasma depurado de una sustancia ideal (filtrada a través del glomérulo y que no se secreta ni reabsorbe en el túbulo renal) por unidad de tiempo, expresada en ml/minuto” (Traynor *et al.*, 2006; Levey *et al.*, 2015). El valor de la TFG depende de la edad, sexo y estatura, sin embargo, a nivel global se toma como referencia 120-130 ml/min/1.73 m² (donde 1.73 m² se considera como una medida estandarizada de la superficie corporal). Estos valores declinan con una razón de 1 ml/min a partir de los 30 años (Stevens *et al.*, 2006; Levey *et al.*, 2015).

2.1.4.5 Medición de la tasa de filtrado glomerular

La TFG no puede ser medida directamente, se pueden realizar estimaciones a través de diferentes metodologías (Levey *et al.*, 2015). Se describen las más importantes:

Marcadores de filtración exógenos

Inulina: Considerada como una sustancia ideal, cuando es filtrada por el glomérulo no es absorbida ni secretada en los túbulos renales (Durán & Rivera, 2017; Loredó *et al.*, 2017).

Radioisótopos: También conocidos como radiofármacos (CrEDTA, Tc-DTPA y I-lotalamato), su aplicación es intravenosa y su medición está determinada por la velocidad de desaparición por eliminación renal (Durán & Rivera, 2017; Loredó *et al.*, 2017).

2. Marcadores de filtración endógenos

Creatinina (Cr): Los resultados son similares a los hechos a través de inulina. La creatinina es considerada como un producto metabólico casi exclusivo de la actividad muscular, los niveles en plasma presentan ligeras fluctuaciones entre personas con función renal estable (Durán & Rivera, 2017). La síntesis de creatinina es proporcional a la masa muscular (1mg de Cr/20 g de músculo), es filtrada por el glomérulo y no es reabsorbida pero sí secretada en el túbulo proximal. Cuando la TFG disminuye, la secreción de creatinina incrementa gradualmente hasta llegar a la saturación (Flores *et al.*, 2009; Grilo & Schurch, 2019).

Aclaramiento de creatinina (CrCl): Se calcula a partir de la Cr plasmática y una recolección urinaria de 24 h. Se aplica la ecuación " $\text{CrCl (ml/min)} = U \times V / P$ ", donde U corresponde con la concentración de creatinina en la orina (mg/dl), V hace referencia al volumen minuto de orina (ml/min) y P es la concentración en plasma de creatinina (mg/dl)", (Durán & Rivera, 2017). A pesar de que el aclaramiento de creatinina es la metodología más empleada para el cálculo de la TFG presenta limitantes, dentro de las principales está la recolección de orina de 24 h, además se heredan los errores de la Cr en plasma y se sobreestima el volumen de filtrado glomerular (Flores *et al.*, 2009).

3. Estimación de la TFG mediante ecuaciones

La finalidad es predecir la TFG basados en los resultados de los niveles de creatinina en plasma, se incluyen variables como el sexo, edad, tamaño corporal y raza (Grilo & Schurch, 2019). Las ecuaciones mayormente empleadas son las siguientes:

Cockcroft-Gault (CG): Empleada en el ajuste dosis-fármaco y es referencia para el cálculo de la TFG, sin embargo, no es aconsejable su empleo ya que no ha sido adaptada para los métodos contemporáneos de medida de creatinina (Irigoyen *et al.*, 2017).

Modificación de la dieta en enfermedad renal (MDR-4): Si el método empleado por el laboratorio para la medición de creatinina es IDMS (espectrometría de masas-dilución isotópica) la ecuación se llamará MDR-IDMS, si el método empleado no fue a través de IDMS entonces la ecuación solo tendrá por nombre MDR-4 (Stevens *et al.*, 2010).

Colaboración Epidemiológica de la Enfermedad Renal Crónica CKD-EPI: Presenta mayor exactitud y mejora la predicción de la TFG (valores comprendidos entre 60-90 ml/min/1.73 m²). Además, ha demostrado mejores resultados en comparación con otras ecuaciones (MDR-4) basadas en la concentración sérica de creatinina (Stevens *et al.*, 2010; Martínez-Castelao, 2014).

2.2 Nefropatía

El término de nefropatía se ha acuñado para caracterizar al conjunto de lesiones renales originadas por un daño de tipo vascular o microvascular, esto da como resultado alteraciones en la función y estructura de los glomérulos e incluso alteraciones de nivel tubular (Quesada *et al.*, 2016). En etapas iniciales, la nefropatía se caracteriza por un estado de hiperfiltración glomerular al mismo tiempo en que incrementa la excreción de albúmina, si esta condición no se corresponde con atención inmediata, la excreción de albúmina tiende a incrementar hasta llegar a un estado de proteinuria, otra problemática que deriva en la mayoría de los casos es el descenso en la TFG acompañado de un incremento en la tensión arterial (Martínez-Castelao, 2014; Quesada *et al.*, 2016).

La nefropatía es declarada por la presencia de proteinuria superior a los 300 mg/24 h. Cuando el diagnóstico implica valores menores a los 300 mg/24 h (microalbuminuria) se habla de daño renal precoz o nefropatía incipiente (Haneda *et al.*, 2015).

2.3 Aminopeptidasas como biomarcadores tempranos de daño renal

Actualmente, el diagnóstico temprano de la ERC representa un problema clínico. Como se ha descrito anteriormente, las metodologías tradicionales (creatinina, albuminuria, sedimento urinario, etc.) proporcionan información de lesión renal tardía (Devarajan, 2007; Bonventre *et al.*, 2010; Quesada *et al.*, 2017), aunado a que estos marcadores presentan poca sensibilidad y especificidad y no diferencian adecuadamente del lugar en donde se ha generado la lesión renal (Vaida *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que los niveles de creatinina plasmática tienden a acumularse con el tiempo por lo que los cambios en su concentración son evidentes cuando los riñones han perdido al menos la mitad de su funcionalidad (Devarajan, 2007; Bonventre *et al.*, 2010).

Alanil aminopeptidasa (AlaAp), es una exopeptidasa de 937 aminoácidos en la estructura primaria que se encuentra en el borde en cepillo de las células tubulares renales, esta enzima desempeña funciones protagónicas en diferentes procesos fisiológicos dentro de los que destaca el metabolismo de los péptidos involucrados en la analgesia, el control de la presión arterial, motilidad y adhesión celular. Además, se ha reportado que una elevada actividad de esta enzima está implicada en la patogenia de enfermedades como el cáncer y el daño a algunos órganos y sistemas (Pascual *et al.*, 2015).

Glutamil aminopeptidasa (GluAp) es una ectoenzima homodimérica metalopeptidasa unida a membrana dependiente de zinc de 170 kDa que hidroliza selectivamente residuos de aminoácidos ácidos desde el extremo amino de oligopéptidos. Se ha reportado que esta enzima degrada a la angiotensina II en angiotensina III, y por lo tanto ayuda a regular la presión arterial. GluAp se expresa en tejidos periféricos como el intestinal y las células del epitelio renal y el endotelio vascular (Lojda & Gossrau, 1980).

Alanil aminopetidasa (AlaAp) y glutamil aminopetidasa (GluAp) son enzimas presentes en las células tubulares renales, donde ejercen una función aminopeptidásica en el metabolismo de la angiotensina II, una hormona vasoactiva intrarrenal que funciona como sustrato para la GluAp y que se incrementa en los trastornos renales, cuando se genera un proceso de lesión a nivel renal, su contenido puede liberarse al ultrafiltrado, y

hasta ahora, se ha proporcionado evidencia suficiente para sugerir que pueden funcionar como biomarcadores para la detección temprana de daño renal. La valoración de la actividad de las aminopeptidasas urinarias está relacionada con la extensión de la disfunción renal y se plantea su uso como biomarcadores que pongan de manifiesto el lugar donde yace la lesión (Quesada *et al.*, 2012).

2.4 Modelo animal de daño renal provocado por la ingesta de fructosa

Diversas investigaciones a nivel mundial han proporcionado pruebas en donde se demuestra que el síndrome metabólico es un factor bien establecido para la progresión de la diabetes, por ejemplo, estudios realizados en ratas Zucker obesas a las que se les ha administrado una dieta rica en carbohidratos, a las cuales se les ha desarrollado inicialmente un cuadro de síndrome metabólico y posteriormente alteraciones características de la diabetes (Li *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Montoro-Molina *et al.*, 2018), sin embargo, una de las repercusiones fisiológicas y anatómicas más notorias de este padecimiento son las lesiones renales (Kurella *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que una de las principales características de la dieta occidental es la ingesta excesiva de alimentos con alto contenido en hidratos de carbono, azúcares y grasas, y dentro de los azúcares con mayor incidencia en su consumo yace la fructosa. Aunado a esto, se ha planteado la hipótesis donde se sugiere que la fructosa es uno de los principales factores que predisponen al desarrollo del síndrome metabólico y como consecuencia, el desarrollo de ERC (Elliot *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Jacobson, 2004; Jürguens *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2006). Además, esta hipótesis se fundamenta en estudios realizados con animales a los que se les ha administrado un alto contenido de fructosa en la dieta, dando como resultado la inducción de daño renal (Khizner *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2006). Además, las bebidas no alcohólicas ricas en azúcar son de las principales fuentes de consumo de fructosa en el humano (Gao *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013), por lo tanto, basado en esta inferencia y en estudios previamente reportados (Yang *et al.*, 2014) se ha propuesto la utilización de agua potable y fructosa al 10% como vía de administración para replicar los efectos del síndrome metabólico en el modelo animal empleado para este estudio (Yang *et al.*, 2014).

2.5 La medicina tradicional

De acuerdo con la “Organización Mundial de la Salud (OMS), se define a la medicina tradicional como el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias indígenas (de las diversas culturas), usadas para la prevención, diagnóstico, mejora y/o tratamiento de enfermedades físicas o mentales”.

La medicina tradicional, está basada en el conocimiento botánico, se adapta a los contextos poblacionales, así como al espacio y tiempo, además, los principales poseedores de tales conocimientos son los pueblos originarios (Mejía *et al.*, 2017), por lo que su praxis no es novedad ya que el consumo de compuestos bioactivos con fines terapéuticos se remota hasta hace 2 millones de años en el continente africano (Chifa, 2010). A nivel mundial, el empleo de las plantas tiene gran relevancia y es una prioridad para instituciones como la Organización Mundial de la Salud, la Organización de las Naciones Unidas y la Organización Internacional para la Propiedad Intelectual. En México, es reconocida por la Secretaría de Salud, el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales y la Comisión Nacional para el Uso y Conservación de la Biodiversidad (Mejía *et al.*, 2017).

Y hablando sobre el uso de la medicina tradicional en el país, es practicada por 60 grupos étnicos, los cuales, en conjunto utilizan un aproximado de 5,000 plantas (Juárez Rosete *et al.*, 2013) y en áreas urbanas se recurre a ellas a través de la herbolaria (Torres *et al.*, 2005). Las plantas medicinales, en su gran mayoría crecen de forma silvestre, incluso, algunas plantas de las cuales ya se han comprobado sus propiedades de manera científica, se cultivan para su exportación hacia Estados Unidos y Canadá (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

Sobre el mismo contexto, se ha observado una creciente ola de enfermedades, donde las sociedades modernas están buscando alternativas para lograr un bienestar físico y psicológico, una opción es a través del uso racional y consciente de las plantas (Mejía *et al.*, 2017), incluso, existe una amplia aceptación en las sociedades urbanas, debido a la

motivación de nuevas formas de cura, tratamientos o complementos que coadyuven con la medicina alópata (Porrás & Álvarez, 2013).

Recientemente, la OMS declaró que aproximadamente el 80% de la población a nivel mundial ha recurrido o recurre de alguna manera a la medicina tradicional (Porrás & Álvarez, 2013). Estos datos sugieren un interés hacia la investigación formal de los metabolitos secundarios de las plantas, para verificar su seguridad y eficacia al momento de ser administrados como adyuvantes para el tratamiento de alguna enfermedad (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

2.5.1 El género *Eryngium*

Eryngium es uno de los géneros más numerosos de las Apiaceae. Este grupo alberga un aproximado de 250 especies y su distribución geográfica corresponde a las regiones templadas y pastizales sobre el planeta (García-Ruíz, 2013).

Eryngium pertenece a la subfamilia Saniculoideae Drude, de la familia Apiaceae Lindley. Algunas características definitorias son su naturaleza perenne, muchas de ellas son glabras, erectas, y sus raíces tienden a ser fuertes y fibrosas, de hojas simples, lobadas o espinosas dentadas con venación variable. La disposición de las flores suele estar a manera de cabezuelas bracteadas, el cáliz, en la mayoría de los casos está mejor desarrollado que la corola, los pétalos son de color blanco y en algunas variedades se han reportado colores purpúreos. Los frutos tienen morfología ovoide y suelen estar cubiertos con escamas o tubérculos (Mathias & Constance, 1941).

“*Eryngium* es fácilmente distinguible de otros miembros de las Apiaceae por sus inflorescencias capitadas y por tener una sola bractéola por flor”. Respecto al tamaño, algunas especies son de unos pocos centímetros de largo mientras que otras pueden llegar a medir hasta 3 metros de alto (Calviño *et al.*, 2008). En general, la polinización es entomófila. Se ha reportado que varias especies de *Eryngium* son comestibles o se cultivan con fines ornamentales (Heywood *et al.*, 1993), en otros casos se aprovechan

las raíces, hojas y flores con distintos fines medicinales (Mabberley, 1997; Ramírez-Delgadillo *et al.*, 2010).

2.5.2 Aplicaciones del género *Eryngium*

Varias especies del género *Eryngium* se han empleado en la medicina tradicional mexicana, de acuerdo con datos proporcionados por la Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), entre los usos más importantes destacan los remedios diuréticos, estimulantes del apetito, antiinflamatorios y laxantes.

En estados como Michoacán, Puebla e Hidalgo se emplean para contrarrestar las complicaciones causadas por infecciones estomacales, infecciones de las vías urinarias y padecimientos renales. En algunas regiones del Estado de México se han empleado como tratamiento contra la tos. En la mayoría de los casos se preparan infusiones y decocciones con las flores, hojas y tallos, siendo la vía de administración oral, sin embargo, se ha reportado que en dosis elevadas son altamente venenosas y pueden provocar intoxicación u otro tipo de complicaciones para la salud del individuo en cuestión (UNAM, 2014).

Respecto a la validación a través de procedimientos científicos, Price, en el 2016 reportó el efecto antiveneno de *Eryngium yuccifolium* contra mordeduras de serpiente empleando el extracto acuoso de dicha planta. También se han descrito propiedades antioxidantes (Darriet *et al.*, 2014), antiinflamatorias (Lisciani *et al.*, 1984), antimicrobianas (Thiem *et al.*, 2010) y antifúngicas (Kholkhal *et al.*, 2012) empleando las partes aéreas y las raíces de *E. maritimum*.

Noriega-Cisneros y colaboradores, en el 2012 reportaron el efecto hipolipemiante empleando el extracto etanólico de *E. carlinae* en un modelo animal inducido por streptozotocina. Pérez- Ramírez y colaboradores, en el 2016 reportaron que la misma planta administrada en forma de decocción reducía los niveles de estrés oxidativo, lípidos renales y ácido úrico en plasma, además, se observó una disminución en los niveles de

albúmina en orina e incremento en el aclaramiento de creatinina. Finalmente el extracto acuoso disminuyó los niveles de proteínas relacionadas con la glomeruloesclerosis y fibrosis tubular en ratas obesas.

Otras investigaciones han puesto de manifiesto las propiedades antinociceptivas en estudios con ratones a los cuales se les indujo edema mediante carragenano, las propiedades antiinflamatorias se determinaron mediante la inhibición de la hinchazón en el oído del ratón causado por la administración de TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). Ambos experimentos fueron evaluados mediante la administración tópica y oral de la decocción de *E. foetidum* (Saenz *et al.*, 1997). Sobre la misma línea de investigación, la administración oral y tópica de los extractos acuosos y etanólicos de *E. campeste*, *E. maritimum*, *E. creticum* y *E. kotschy* tuvieron efectos benéficos y se ha planteado su uso como adyuvantes contra estos padecimientos.

A pesar de los trabajos reportados para confirmar o bien refutar las propiedades terapéuticas de ciertas especies pertenecientes al género *Eryngium*, el abanico de oportunidades es bastante extenso ya que la gran mayoría de estas plantas no se han estudiado o su investigación es limitada. Por esta razón es importante redoblar esfuerzos para proponer nuevas alternativas que puedan ayudar a mejorar la calidad de vida de las sociedades modernas.

2.5.3 *Eryngium alternatum* como alternativa en la enfermedad renal

Eryngium alternatum es una planta perenne, erecta, glabra, de tipo leñosa, de tallo solitario, su tamaño oscila entre 50 cm a 1.5 metros de alto y anchura aproximada de 2.5 cm, sus hojas son alargadas y puntiagudas con bordes espinosos, el ápice es acuminado y posee numerosas flores que crecen en los extremos de las ramas. Crece en zonas boscosas y templadas, entre los 2400-3900 msnm, la floración ocurre en los meses de abril y mayo, y fructifica de julio a noviembre. En México, se conoce su distribución en el Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla (García-Ruíz, 2013).



Figura 1. *Eryngium alternatum*. Valderrábano Roldán

2.6 Extractos vegetales

2.6.1 Métodos de extracción empleados en plantas medicinales

Para la obtención de una concentración adecuada de los principios activos contenidos en la planta y que su acción sea más efectiva, es necesaria la aplicación de procedimientos físicos o químicos (Ringuelet & Viña, 2013). Para extraer los principios activos se debe considerar la existencia de diferentes métodos, en la mayoría se requiere de un líquido extractivo que dependerá del procedimiento y de la naturaleza química del compuesto de interés (Carrión Jara & García Gómez, 2010).

2.6.2 Tipos de extracción

Los métodos de extracción permiten obtener productos adecuados para su administración de forma oral o tópica, todo dependerá del lugar en donde se quiera que tenga efecto activo el extracto (producto del método de extracción). Las preparaciones pueden ser decocciones, percolaciones, maceraciones, digestiones e infusiones (Sharapin, 2000).

Percolación: El solvente debe atravesar la masa de la planta (pulverizada) en un solo sentido. Para realizar este tipo de extracción se requiere de un percolador, el cual consiste en un recipiente cónico con una abertura superior que permite el paso del líquido. En la parte inferior, el percolador contiene un regulador (para lograr el paso de la solución de manera uniforme). Antes de realizar el colado, material vegetal se debe humedecer en el percolador con una cantidad apropiada de solvente, y deberá reposar por un tiempo determinado. Pasado ese lapso, se debe permitir el paso del líquido en el percolador, se abrirá la salida inferior del instrumento hasta presentarse un goteo uniforme, para finalizar, se deberá ejercer presión en la masa húmeda (residual) para extraer la mayor cantidad de líquido que sea posible (Torres *et al.*, 2005).

Maceración: Consiste en el contacto prolongado de la planta con el solvente, constituyendo una mezcla de apariencia homogénea. La mezcla de la planta y el solvente se debe proteger de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración puede ser muy variable,

sin embargo, se recomienda un lapso de entre cuatro y diez días (Carrión Jara & García Gómez, 2010).

Infusión: La planta se pone en contacto con un solvente hasta alcanzar la temperatura de ebullición del solvente, este proceso se mantiene durante cinco minutos y posteriormente se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se prepara a una concentración del 5% (Sharapin, 2000; Leonora, 2015).

Digestión: Es un proceso similar a la maceración, la diferencia yace en que se realiza a una temperatura que oscila entre los 50 y 60 °C. Al aumentar la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente, lo que hace que pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión Jara & García Gómez, 2010; Leonora, 2015).

Decocción: Consiste en llevar a la mezcla de la planta con el agua hasta la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un periodo variable que suele oscilar entre los 10 y 30 minutos (Sharapin, 2000).

A partir de estas sencillas preparaciones, se han desarrollado técnicas que han permitido la materialización de las sustancias activas en forma pura, para posteriormente elaborar preparaciones más sofisticadas en forma de medicamentos, ungüentos, cápsulas, jabones, etc (Carrión Jara & García Gómez, 2010).

2.6.3 Principios activos

Los principios activos son aquellos componentes de las plantas medicinales que presentan acción farmacológica, cuya finalidad es generar un efecto (terapéutico) en el organismo. Los principios activos pueden ser de diferentes tipos, sin embargo, se pueden clasificar en dos grandes grupos, los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios (Sharapin, 2000; Ringuelet & Viña. 2013).

2.6.3.1 Metabolitos primarios y secundarios

Los metabolitos primarios son todos los compuestos esenciales para el funcionamiento armónico de una planta, son los responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener su estado óptimo, posibilitar su crecimiento, desarrollo y reproducción. Por otra parte, los metabolitos secundarios cumplen funciones que no resultan vitales para la planta, y representan, en ocasiones, compuestos de desecho del metabolismo primario. No están directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo y tampoco participan en procesos tales como la obtención de energía. Muchos son aprovechados por la planta para interactuar con el medio ambiente, ya sea para atraer insectos u otros polinizadores, repeler depredadores y seres patógenos, además, pueden impedir la competencia con otras especies y adaptarse a condiciones adversas presentes en el suelo, clima, etc., en pocas palabras, cumplen con funciones de índole ecológica (Ringuelet & Viña, 2013).

Desde la perspectiva farmacológica, los metabolitos secundarios son los responsables de la actividad terapéutica de las especies vegetales (Carrión Jara & García Gómez, 2010). Los compuestos más importantes de los metabolitos primarios y secundarios se ilustran en la tabla 4.

Compuestos procedentes del metabolismo primario	Compuestos procedentes del metabolismo secundario
Glúcidos Lípidos y grasas Aminoácidos y proteínas Ácidos nucleicos Compuestos nitrogenados (enzimas, glúcidos cianogénicos)	Isopreniodes: terpenos, saponinas, cardiotónicos, aceites esenciales Derivados fenólicos: fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides, antocianinas Alcaloides

Tabla 4. Resumen de los principales metabolitos primarios y secundarios sintetizados por una planta.

2.6.3.2 Metabolitos secundarios

Gran diversidad de metabolitos secundarios ha sido y son utilizados por el hombre para aplicarlos en la industria farmacéutica, son comúnmente llamados “productos naturales” o “productos vegetales” y representan moléculas de variadas estructuras, diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos. Por ello, el término “productos naturales se refiere generalmente a los metabolitos secundarios, con real o potencial utilidad para el hombre y para la adaptación de la planta al medio ambiente” (Ringuelet & Viña, 2013).

Las rutas metabólicas básicas de síntesis de los metabolitos primarios son el precursor *in vivo* de todos los metabolitos secundarios y darán lugar a una cantidad diversa de compuestos, algunos de estos son los responsables de los olores característicos de la planta, colores, características organolépticas culinarias, y para nuestro caso, de las características medicinales o venenosas (Carrión Jara & García Gómez, 2010).

Los metabolitos secundarios se acumulan en las células de la planta, o bien, pueden ser expulsados de ella, los más importantes son:

Isoprenoides: “Se constituyen a través de la ruta del ácido mevalónico a partir del acetyl coenzima A (AcetylCoA), donde se incorporan unidades de C5, presentan estructuras diversas y pueden encontrarse como tal o formando parte de compuestos más complejos”. A los isoprenoides se los puede clasificar de la siguiente manera:

Terpenos: Los elementos estructurales básicos de los terpenos se conocen como unidades de isopreno, debido a que los terpenos pueden descomponerse a altas temperaturas dando como resultado su unidad estructural (isopreno), (Kuklinski, 2000).

Aceites esenciales: “Son sustancias volátiles de naturaleza compleja, se asocian a resinas y productos cosméticos. Los aceites esenciales se encuentran exclusivamente en vegetales superiores” (Kuklinski, 2000).

Saponinas: Son estructuras formadas por una parte glucosídica y un aglicón (no glucosídica), su nombre se debe a sus propiedades jabonosas (Carrión Jara & García Gómez, 2010).

Cardiotónicos: “Están formados por una parte glucosídica (constituida por una o varias unidades de azúcar) y un aglicón unido a un anillo lactónico insaturado” (Kuklinski, 2000).

Alcaloides: Los alcaloides tradicionales son de origen vegetal, contienen uno o más átomos de nitrógeno (generalmente en anillo heterocíclico).

Derivados fenólicos: Consisten en un “grupo hidroxilo en un anillo aromático, que les confiere una estructura fenólica. Existen dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis, la primera corresponde con la ruta del acetato que conduce a la formación de cadenas policíclicas que mediante ciclación dan lugar a compuestos policíclicos aromáticos y la ruta del ácido shikímico que es precursor de una serie de ácidos benzoicos hidroxilados y aminados”. En la mayoría de los casos los compuestos aromáticos provienen de la misma ruta y suelen formarse por desaminación de aminoácidos aromáticos (Castillo García, 2007).

Los compuestos fenólicos más importantes son los siguientes (García Bacallao *et al.*, 2002; Márquez Hernández *et al.*, 2017):

Fenoles simples: Son poco frecuentes, “en las plantas se encuentran en forma de heterósidos, son sustancias no reductoras que por hidrólisis ácida o enzimática dan uno o más azúcares y un componente no azucarado llamado aglicona”.

Ácidos fenólicos: “Se pueden encontrar libres o unidos a azúcares (heterósidos), pueden formar ésteres al unirse tanto con el ácido quínico como con otro ácido fenólico”.

Lignanós: Son compuestos que poseen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano.

Cumarinas: “Son derivados de la benzo- α -pirona, muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos”.

Taninos: Poseen un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica.

Quinonas: Son compuestos que pueden estar fusionados con anillos aromáticos y grupos cetona.

Flavonoides: Los flavonoides constituyen un grupo amplio de fenoles, “se encuentran tanto como agliconas libres o en forma de heterósidos. En la actualidad se conocen más de 2000 de estos compuestos. Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos”. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores, frutos.

2.7 Modelos *In vivo*

2.7.1 Modelo de *Artemia* spp.

Uno de los modelos *in vivo* con mayor demanda en las primeras etapas de la investigación en ciencias biológicas es el ensayo de letalidad con el modelo de *Artemia* spp. (Meyer, 1982; Sánchez & Neira, 2005; Fernández *et al.*, 2009; Arcanjo, 2012).

Las artemias son pequeños crustáceos cuya edad en la Tierra data desde hace 100 millones de años. Desde finales de la década de los sesenta y hasta nuestros días, los quistes de *Artemia* spp., han permitido el desarrollo de variadas líneas de investigación incluyendo las pruebas de toxicidad para la validación de la letalidad de diversos compuestos (Neli, 2015).

Respecto a su distribución, es muy amplia, y se puede encontrar en todos los continentes (a excepción de la Antártida), las diversas especies de artemia se pueden encontrar en aproximadamente 300 lagos salinos (naturales y artificiales) sobre el planeta, por lo tanto, suelen encontrarse en zonas acuáticas con alta salinidad, llegando a sobrevivir en aguas con concentraciones iguales o mayores a los 300 g de sal/l de agua. Sin embargo, su rápida adaptación les ha permitido reproducirse y desarrollarse en aguas dulces e incluso en zonas con bajas concentraciones de oxígeno (0.5 mg de oxígeno por litro de agua), (Neli, 2015).

2.7.1.1 Morfología

Las artemias adultas pueden alcanzar un tamaño de hasta 10 mm en poblaciones bisexuales. En su cuerpo, se distinguen tres partes: cabeza, tórax y abdomen (Figura 2). La cabeza cuenta con un par de antenas que le proporcionan sensibilidad a la especie en cuestión, además, dos ojos pedunculados y un ojo simple (también llamado ojo nauplio) que se desarrolla en su primera etapa de vida y a medida que continúa su desarrollo también se van formando el par de ojos pedunculados más complejos. El tórax cuenta con once segmentos con apéndices torácicos (toracópodos) proporcionándole a la artemia una apariencia más grande, además, la dota de la capacidad de respiración, alimentación y natación. Finalmente, el abdomen, compuesto por los

segmentos genitales (ovisaco en el caso de la hembra y los penes pareados en el caso del macho), los segmentos abdominales, telson y la furca caudal (Neli, 2015; Yockteng, 2017).

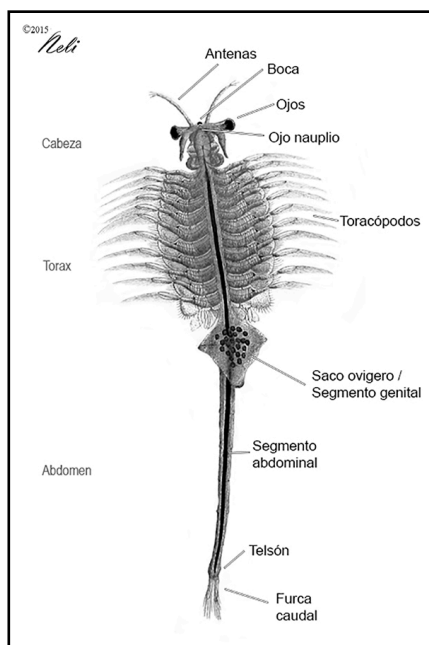


Figura 2. Anatomía de un ejemplar de *Artemia* spp. Tomada de Neli, 2015.

2.7.1.2 Ciclo de vida

Se distinguen cuatro estados morfológicos: nauplios, metanauplios, jóvenes y adultos (Figura 3).

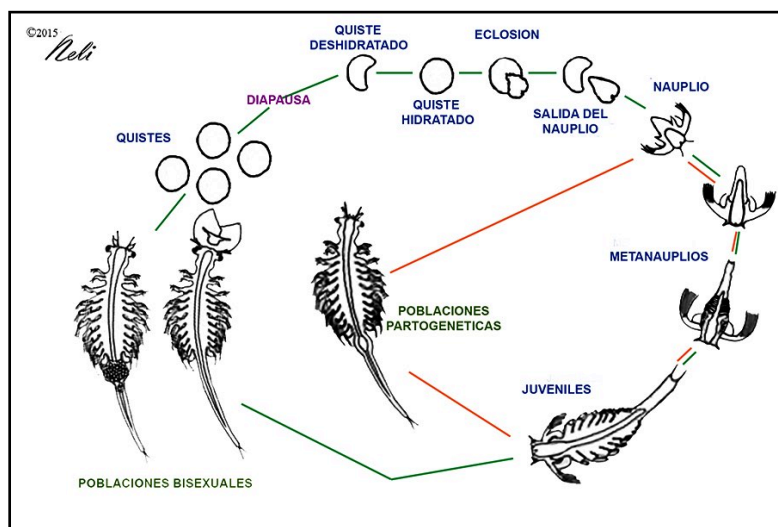


Figura 3. Ciclo de vida de *Artemia* spp. Tomada de Neli, 2015.

Nauplio: “La larva recién nacida se caracteriza por la ausencia de segmentos en el cuerpo, además, presenta una cantidad generosa de vitelo, su sistema digestivo aún no se ha completado, por lo que no habrá adquirido la capacidad de alimentarse del exterior. Su color característico es rojizo o anaranjado, se observa la presencia del ojo central (ojo nauplio) y puede tener una longitud aproximada de 250 micras, los nauplios, permanecerán en la etapa conocida como nauplio 1 aproximadamente 10 horas, mientras se encuentren a una temperatura aproximada de 25 °C”. Posteriormente, pasarán a la sub-etapa conocida como nauplio 2, la cual tiene una duración aproximada de 15-20 horas y es aquí donde se llevará a cabo la formación del sistema digestivo (Yockteng, 2017).

Metanauplio: Es el periodo largo de la fase larval, se desarrollan los teracópodos y se da un incremento en su tamaño (250-400 micras), (Yockteng, 2017).

Joven: En esta etapa se manifiesta el dimorfismo sexual (especialmente por la forma que adoptan las antenas). En el caso de los machos, la morfología característica de las antenas es de tenazas y en el caso de la hembra, las antenas tendrán una forma de hoja (Yockteng, 2017).

Adulto: “Se diferenciarán claramente la cabeza, tórax y abdomen. El dimorfismo sexual será evidente, además se observará el comportamiento copulativo resultado de su madurez sexual. La hembra presentará en la región abdominal el saco ovígero donde desarrollará los huevos” (Yockteng, 2017).

2.7.1.3 Ensayo de letalidad

El ensayo de letalidad de *Artemia* spp., se basa en la posibilidad de causar la muerte de este crustáceo cultivado bajo condiciones de laboratorio. Este método, inicialmente fue propuesto en 1956 por Michael y colaboradores, y posteriormente desarrollado por Vanhaecke en 1981 con el propósito de contar con una herramienta confiable y sencilla para la determinación de la toxicidad de diversos compuestos como metales pesados, toxinas de hongos y extractos de plantas. Por esta razón, resulta de gran utilidad la

determinación del valor de la concentración letal media (CL_{50}) de los compuestos en estudio cuando se combinan con el medio salino en donde están inmersas las artemias (Parra *et al.*, 2001; Arcanjo, 2012).

Para el ensayo se utilizarán nauplios de 24 h de nacidos. Posteriormente, se colocan 10 nauplios en un tubo de ensayo e inmediatamente se adiciona el extracto de la planta que se desea analizar en sus diversas concentraciones (previamente mencionadas), (Meyer, 1982; Arcanjo, 2012; Sangian *et al.*, 2013).

Los nauplios con las concentraciones del extracto se incuban por un periodo adicional de 24 h. Transcurrido este lapso, se analiza cada tubo, y se procede al conteo de artemias vivas y muertas, las larvas se consideran muertas si no exhiben movimientos durante varios segundos de observación. Para considerar la validez del ensayo, el porcentaje de artemias muertas en los grupos control no debe exceder del 10% (tubos de ensayo con las artemias incubadas bajo las mismas condiciones, pero sin el extracto). Para que los resultados sean estadísticamente significativos, cada concentración se debe evaluar por triplicado y se emplearán para el análisis estadístico y cálculo de la concentración letal media (Arcanjo, 2012; Sangian *et al.*, 2013). Para determinar el grado de toxicidad, los datos se podrán comparar con los rangos de toxicidad recomendados por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), (Pinzón & Sánchez, 1995).

2.7.2 Modelo de daño renal en ratas con síndrome metabólico

Actualmente, la ERC se ha convertido en un problema de salud pública. Dentro de las causas más frecuentes de su desarrollo se encuentran el síndrome metabólico. Algunos de los factores primarios que potencian el progreso de estas enfermedades yacen el sobrepeso y la obesidad (del Olmo, 2016; Mariscal-Ramírez *et al.*, 2019) y son desarrollados por la inactividad física en conjunto con la dieta occidental que es rica en alimentos con alto contenido calórico y graso (Nakayama *et al.*, 2010; Oudot *et al.*, 2013).

Dentro de los alimentos con alto contenido calórico destacan las bebidas carbonatadas como los refrescos y los postres, dentro de los alimentos con elevado contenido graso podemos citar a las carnes rojas y derivados lácteos (Yang *et al.*, 2014). Es importante resaltar que los azúcares, y especialmente la fructuosa, son uno de los productos que más ha incrementado en cuanto a su uso global se refiere (Yang *et al.*, 2014; Mariscal-Ramírez *et al.*, 2019). Por esta razón, se ha sugerido que el consumo de esta pueda estar relacionada con el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. Diversos estudios respaldan la hipótesis que sugiere que un alto contenido de fructosa en la dieta es capaz de inducir ERC (Nakayama *et al.*, 2010; Oudot *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Mariscal-Ramírez *et al.*, 2019).

Como en todas las investigaciones de nivel básico dentro del ramo de las Ciencias Naturales, los estudios en modelos animales han consolidado una herramienta invaluable para la comprensión de los procesos de salud y enfermedad de diversas enfermedades dentro de las que se encuentran las nefropatías (Aleixandre, 2008). Gran parte de trabajos se han desarrollado en roedores debido a que presentan una alta homología con el ser humano sin mencionar su rápido crecimiento, adaptabilidad y coste. Por esta razón, se optó por la realización de ensayos *in vivo* que puedan simular las complicaciones que el síndrome metabólico genera en los seres humanos. Uno de los modelos mejor aceptados deriva de las ratas Wistar (macho) adultas a las que se les ha administrado una concentración elevada de fructosa en el agua de bebida durante al menos 4 semanas (Kok *et al.*, 1996; Ayala *et al.*, 2008; Nakayama *et al.*, 2010; Oudot *et*

al., 2013; Yang *et al.*, 2014). Por esta razón se consideró este modelo durante un periodo de 6 semanas.

2.8 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto

“Los radicales libres son moléculas que se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados en su orbital externo, por esta condición, se tornan altamente reactivos (González & Saavedra, 2019)”. En el ser humano, los radicales libres se generan por procesos cotidianos, uno de los ejemplos representativos es la respiración celular efectuada en las mitocondrias. Para el caso de los seres vivos, existen mecanismos de defensa antioxidantes, cuya propiedad es la de impedir la toxicidad efectuada por los radicales libres, algunos de estos compuestos son de naturaleza enzimática como la catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, etc., además, se han identificado otras sustancias no enzimáticas como el ácido ascórbico, ferritina, polifenoles y antocianinas cuyo objetivo en los sistemas vivos también es el neutralizar a los radicales libres (Pandey *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2018).

Sin embargo, cuando el repertorio de mecanismos antioxidantes es insuficiente para hacer frente a los radicales libres, se puede presentar el fenómeno del estrés oxidativo, condición que está relacionada con patologías como el cáncer, diabetes, aterosclerosis, hipertensión arterial, entre muchas otras (Babbar, Oberoi & Sandhu, 2015).

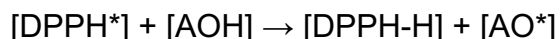
Diversos estudios al rededor del planeta han evidenciado el efecto benéfico que tienen las frutas, verduras y plantas, con una disminución en el riesgo de padecer las enfermedades previamente mencionadas, todo esto por acción de su elevado contenido de polifenoles, flavonoides, antocianinas, vitamina C y carotenos, por mencionar algunas (Babbar, Oberoi & Sandhu, 2015).

Para dar validez de las propiedades antioxidantes de las plantas o derivados, se han desarrollado diversas técnicas cuyo objetivo está centrado en la evaluación de su capa-

cidad antioxidante (Dar *et al.*, 2017), una de las técnicas más empleadas por su eficiencia, economía y veracidad de resultados es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), (Abramovič *et al.*, 2017).

“El DPPH, tiene la propiedad de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante”. Estudios cinéticos han puesto de manifiesto que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden que puede estudiarse midiendo la disminución de la absorbancia con respecto al tiempo. Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida ulteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos (Mishra *et al.*, 2012).

La reacción entre el DPPH vs un antioxidante se puede representar de la siguiente manera:



Por lo tanto, “la molécula de DPPH, al ser un radical libre y estable, que en disolución metanólica presenta un color violeta intenso y con una fuerte absorción a 515 nm, al ser mezclada con una sustancia antioxidante podrá donar un átomo de hidrógeno reduciendo al radical DPPH y como consecuencia de esta reacción se observará una pérdida del color violeta, la cual es estequiométrica con respecto al número de electrones que capture, tornándose de violeta a un amarillo pálido (Molyneux, 2004)”. Los resultados obtenidos en el proceso experimental se reportarán como porcentaje (%) de inhibición (Sharma & Bhat, 2009; Mishra *et al.*, 2012).

3. Justificación

México ocupa los primeros lugares a nivel mundial respecto a la incidencia de síndrome metabólico (Soto-Estrada *et al.*, 2016). Estudios previos realizados por la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) han reportado que es una de las principales causas de ERC, mientras que la esta última es una de las 10 causas más frecuentes de hospitalización en adultos (Romero-Martínez *et al.*, 2017). A nivel global, se ha reportado que la ERC representa un problema latente de salud pública que incrementa año con año y agrava aproximadamente al 10% de la población adulta (Cortés-Sanabria *et al.*, 2017). Aunado a esto, la ERC posee un periodo de latencia extenso con una fase preclínica que en la mayoría de casos pasa desapercibida, por lo que, la probabilidad de que los pacientes sean tratados de forma eficiente es baja (Carracedo & Muñana, 2012; Bullón *et al.*, 2018). Por estas razones ha surgido la preocupación por desarrollar un tratamiento a base de extractos naturales que en conjunto con la medicina alópata ayuden a mejorar la calidad de vida de las personas que cursan por un cuadro de ERC.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* *in vivo* para valorar su utilidad como adyuvante en el tratamiento de la enfermedad renal crónica utilizando un modelo experimental consistente en ratas tratadas con fructosa al 10% durante 6 semanas.

4.2 Objetivos específicos

- I. Seleccionar, recolectar e identificar la planta objeto de estudio mediante una búsqueda bibliográfica.
- II. Obtención del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* a través de un rotavapor para las pruebas subsecuentes.
- III. Determinar la CL₅₀ del extracto en el modelo de *Artemia* spp., para identificar su toxicidad.
- IV. Evaluar la actividad antioxidante del extracto acuoso mediante el método de captura de radicales libres utilizando el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).
- V. Evaluar de la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* en ratas tratadas con fructosa al 10 % durante 6 semanas.
- VI. Evaluar la utilidad de las enzimas glutamil aminopetidasa (GluAp) y alanil aminopeptidasa (AlaAp) como marcadores tempranos de lesión renal presentes en el modelo de rata.

5. Materiales y métodos

5.1 Recolección del material vegetal

Se recolectó el material vegetal en una sola exhibición de la reserva natural “Cerro de las Navajas” en el Estado de Hidalgo, posterior a la recolección de la planta, uno de los ejemplares se herborizó para ser identificado por el Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla. Además, el material vegetal se secó a la sombra y con ventilación constante para evitar el crecimiento de hongos y la descomposición de los ejemplares.

5.2 Obtención del extracto acuoso

Se realizó un extracto acuoso replicando el uso tradicional. Los tallos y hojas de la planta se hirvieron durante 10 minutos en agua destilada, una vez frío, se realizó una destilación al vacío a través de un rotavapor Büchi r-300 (a 40 °C) con la finalidad de extraer el solvente (agua) para así obtener el extracto de interés. Las muestras obtenidas se mantuvieron en refrigeración constante y se almacenaron en frascos color ámbar, adicionalmente se cubrieron con papel aluminio para protegerlos de la luz.

5.3 Ensayo de letalidad del extracto acuoso en el modelo de *Artemia* spp.

Para realizar las pruebas se remojaron e incubaron 0.2 g/L de quistes de *Artemia* spp. en agua marina artificial con una concentración de cloruro de sodio (NaCl) de 30g/L de agua destilada (sal de mar RBM al 30%), a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con aireación continua. Para el ensayo se utilizaron nauplios de 24 horas de nacidos, la prueba se realizó por triplicado (Meyer, 1982; Arcanjo, 2012; Sangian *et al.*, 2013).

Se colocaron 10 nauplios por tubo de ensayo (5 ml de capacidad), el extracto se disolvió en la solución salina y se evaluó a diferentes concentraciones (10, 30, 50, 100, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$). Como control negativo se colocaron los nauplios en solución salina hasta llegar al volumen de 5 ml (Arcanjo, 2012).

Los nauplios con las concentraciones del extracto se incubaron bajo las condiciones previamente establecidas por un periodo de 24 h. Pasado el tiempo se estudió cada tubo, contabilizando el número de artemias vivas, los resultados obtenidos se emplearon para la estadística y cálculo de la concentración letal media (CL_{50}) empleando el software “Statgraphics” mediante el análisis probit con un intervalo de confianza del 95% (Finney, 1971). Los resultados obtenidos se compararon con los rangos de toxicidad recomendados por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), (Pinzón & Sánchez, 1995).

5.4 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante la actividad de captación de radicales libres del extracto a través del ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), (Pandey *et al.*, 2005; Hara *et al.*, 2018).

Para realizar la prueba se preparó un stock de soluciones madre las cuales contenían lo siguiente:

- 3 mg del reactivo DPPH/ 25 ml etanol (97%).
- 1 mg de ácido ascórbico/ 25 ml de etanol (control positivo).
- 100mg de extracto/ 1 ml de etanol.

Se realizaron pruebas con diferentes volúmenes de extracto con el objetivo de determinar la IC_{50} (concentración a la cual la mitad de los radicales libres son eliminados). Para poder comparar los resultados obtenidos se realizó el mismo ensayo con un antioxidante conocido (ácido ascórbico) y bajo las mismas condiciones (cada experimento se llevó a cabo por triplicado), (Reynoso, 2013).

Una vez adicionada la solución con DPPH a cada tubo de ensayo (tanto del extracto como del control positivo), se procedió a leer la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. La degradación del DPPH se evaluó frente a un control negativo que se preparó al momento (1000 μ l de etanol (97%) y 500 μ l de la solución con DPPH). La actividad antioxidante se expresó como la

inhibición (AA%) del radical DPPH y se determinó mediante la ecuación (Turkmen *et al.*, 2006; Reynoso, 2013):

$$AA\% = \frac{Abs\ control\ negativo - Abs\ muestra}{Abs\ control\ negativo} \times 100$$

5.5 Evaluación de la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* en ratas tratadas con fructosa

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las Directrices de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Jaén y autorizados por la Junta de Andalucía con ID de aprobación 25/06/2018/101.

Veinticuatro ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho con un peso de 2015.5 ± 2.73 g se compraron en laboratorios Janvier (Laval, Francia) y se distribuyeron en tres grupos: “Control”, “Fructosa” y “Fructosa+Extracto” (n = 8 cada grupo). Las ratas del grupo Control fueron alimentadas con una dieta estándar y agua *ad libitum*, las ratas pertenecientes al grupo Fructosa fueron alimentadas con una dieta estándar y se les adicionó en el agua de bebida fructosa al 10% (Yang *et al.*, 2014). Por último, las ratas pertenecientes al grupo Fructosa+Extracto se les administró una dieta estándar y se adicionó en el agua de bebida fructosa al 10% y el extracto acuoso de *E. alternatum* al 0.05% (500 mg/L). Esta dosis de extracto es equivalente a la que se administra en humanos mediante decocción o infusión (Pérez-Ramírez *et al.*, 2016). Los pesos de los animales se determinaron una vez a la semana durante el tiempo que duró el experimento (6 semanas), (Nakayama *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

Una vez transcurrido el periodo experimental, las ratas se colocaron en una jaula metabólica para la obtención de muestras de orina por un periodo de 24 h. Dichas muestras se centrifugaron por 15 minutos a 1000 g, el sobrenadante se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C hasta la realización de las pruebas bioquímicas (Yang *et al.*, 2014; Quesada, 2017).

Finalmente, tras un período de ayuno de 12 h, se obtuvieron muestras de sangre del ventrículo izquierdo bajo anestesia con Ketamina (80mg/kg)/ Xilazina (15 mg/kg), que se recogieron en tubos heparinizados y se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos (Quesada *et al.*, 2017; Montoro-Molina *et al.*, 2018). El plasma se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta la realización de las pruebas bioquímicas. Posteriormente, las ratas se sacrificaron con sobredosis de anestésico para la extracción de muestras de hígado, páncreas, bazo y riñones. Se pesó el riñón y el corazón, y uno de los riñones así como el resto de los órganos se fijaron en una solución de formalina tamponada al 10% durante 72 h y posteriormente se almacenaron en etanol al 70% para los posteriores análisis histopatológicos (Yang *et al.*, 2014; Quesada *et al.*, 2017; Montoro-Molina *et al.*, 2018).

5.5.1 Evolución de peso

Una vez que llegaron los animales de los laboratorios Janvier (Laval, Francia), pasaron por una semana de aclimatamiento en las instalaciones del bioterio, una vez transcurrido el periodo de tiempo, los animales se pesaron; obteniendo un promedio (por animal) de 2015.5 ± 2.73 g. Posteriormente, se inició con el periodo experimental durante 6 semanas más. Para registrar la evolución de peso de los tres grupos experimentales (Control, Fructosa y Fructosa+Extracto), todas las ratas se pesaron cada semana hasta finalizar con el periodo de prueba.

5.5.2 Ingesta de bebida y fructosa

En la semana 5 del experimento, se registró la cantidad de bebida y fructosa que ingerían las ratas de los 3 grupos experimentales para corroborar que la diferencia de peso estaba determinada por la ingesta del extracto y no por variaciones respecto a la cantidad de fructosa o líquido que ingerían las ratas.

5.5.3 Variables morfológicas

Una vez finalizado el periodo experimental, se procedió con la disección de los animales, durante este proceso, se pesaron el riñón y el corazón de todas las ratas que

conformaban a los 3 grupos experimentales. Una vez obtenidos los promedios se realizó una comparativa entre el peso absoluto (PC = Peso del Corazón o PR = Peso del Riñón) y también con el peso relativo ($PC/Peso = \text{Peso del corazón}/\text{Peso corporal}$ y $PR/Peso = \text{Peso del riñón}/\text{Peso corporal}$ para la obtención de diferencias estadísticamente significativas.

5.5.4 Análisis de parámetros bioquímicos

5.5.4.1 Urea, creatinina y glucosa plasmáticas

La evaluación de la urea se determinó mediante un autoanalizador Spin120 basada en la técnica enzimático-colorimétrica de Berthelot que consiste en la reacción de la urea con ureasa y nitroprusiato sódico (Tabbaco *et al.*, 1960).

La evaluación de la concentración de creatinina se determinó mediante un autoanalizador Spin120, el cual emplea la técnica colorimétrica basada en la reacción de Jaffé (Heinegård & Tiderström, 1973), para llevar a cabo la reacción se emplearon reactivos comprados en Spinreact (Barcelona, España).

La evaluación de la glucosa se determinó mediante un autoanalizador Spin120 basada en la técnica enzimático-colorimétrica de la glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD) (Trinder, 1969).

5.5.4.2 Actividad aminopeptidásica (GluAp y AlaAp) en plasma

La actividad plasmática de las aminopeptidasas (GluAp y AlaAp) se realizó por duplicado y se determinó a través de un ensayo de fluorimetría cinética utilizando como sustrato glutamil- β -naftilamida y alanil- β -naftilamida respectivamente.

Antes de iniciar el ensayo fluorimétrico, se preparó una disolución del sustrato, se pesaron 27.23 mg de glutamil- β -naftilamida y 21.43 mg de alanil- β -naftilamida y se disolvieron en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), originando una solución 100 mM, la cual se almacenó en alícuotas de 100 μ l y se congeló a -20 °C hasta su utilización.

Posteriormente, se preparó una solución de incubación que consistía en 9.9 ml de tampón Tris 20 mM, pH=8.7 y 100 μ l de la disolución del sustrato (una alícuota), por lo que al término de este proceso se obtuvo una solución de incubación con una concentración de sustrato 1 mM.

Para la realización del ensayo de fluorimetría cinética se emplearon microplacas de 96 pocillos a las cuales se les inocularon 20 μ l de la muestra y 80 μ l de solución de incubación, el proceso se realizó durante un periodo de 30 minutos a 37 °C.

La cantidad de β -naftilamina liberada como resultado de la actividad de las aminopeptidasas se midió fluorimétricamente a una longitud de onda de emisión de 412 nm, con una longitud de onda de excitación de 345 nm, y se cuantificó utilizando una curva estándar de β -naftilamina a una concentración de 0–200 nmol/ml. Los datos fluorimétricos de las muestras y la curva estándar se tomaron cada minuto durante 30 minutos. Las actividades específicas de las aminopeptidasas se calcularon a partir de la pendiente de la porción lineal del ensayo enzimático y se expresaron como nmol de sustrato hidrolizado por mililitro/minuto (nmol/ml/min o mU/min).

5.5.4.3 Parámetros urinarios

La evaluación de la actividad urinaria de las aminopeptidasas (GluAp y AlaAP) se realizó bajo el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.5.4.2 (Actividad aminopeptidásica de GluAp y AlaAp en plasma).

La evaluación de la proteinuria se determinó mediante un autoanalizador Spin120, el cual emplea la técnica enzimático-colorimétrica basada en la reacción del rojo de pirogalol (Fujita *et al.*, 1983).

Para el caso de la glucosuria, se evaluó por el mismo método por el cual se acotó la glucosa en plasma.

5.5.4.4 Aclaramiento de creatinina

El aclaramiento de creatinina se calculó con base en la siguiente formula:

$$CICr \text{ (ml/min/g riñón)} = \frac{UCr \text{ (mg/dl)} \times \text{Diuresis (ml/g riñón/día)}}{SCr \text{ (mg/dl)} \times 1,440 \text{ min/día} \times 2}$$

Donde: UCr: Concentración de creatinina en orina

Diuresis: Volumen de orina

SCr: Concentración de creatinina en suero

1440: minutos/día

2: Número de riñones por sujeto

5.5.4.5 Correlación entre marcadores urinarios y creatinina

La relación entre los marcadores urinarios y la creatinina se llevó a cabo mediante una correlación lineal.

5.5.4.6 Correlación entre marcadores urinarios y aclaramiento de creatinina

La relación entre los marcadores urinarios y el aclaramiento de creatinina se llevó a cabo mediante una correlación lineal.

5.6 Histopatología

El análisis histopatológico se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada. Se analizaron las muestras de riñón de los tres grupos experimentales. Brevemente, distintas secciones del tejido renal se desparafinaron en xylol y se rehidrataron en soluciones de etanol decrecientes. A continuación, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (HE). Se determinó la presencia de lesiones glomerulares y tubulointersticiales en cada una de las muestras analizadas. El estudio morfológico se realizó mediante doble ciego, utilizando secciones del tejido de 4 μm (Quesada *et al.*, 2012; Montoro-Molina *et al.*, 2018).

6. Resultados y discusión

6.1 Colecta del material vegetal

El material vegetal se colectó el 25 de noviembre del 2017 en la reserva natural del “Cerro de las Navajas”, ubicada en el estado de Hidalgo. Uno de los ejemplares se arborizó y se identificó por el Botánico Allen Coombes como *Eryngium alternatum* (No.Id HUAP0075065) de acuerdo con la clasificación taxonómica llevada a cabo por el Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla (BUAP).

6.2 Obtención del extracto acuoso

Inicialmente se recolectaron 4,750 g de la planta en estado fresco, al secar las partes aéreas de las mismas se obtuvo un peso total de 1,200 gramos, posteriormente, las plantas se sometieron al proceso de decocción y se procedió con el filtrado y evaporación del solvente, finalmente, se obtuvo un extracto acuoso cuyo peso total fue de 27.08 g, que de acuerdo con los cálculos de rendimiento de la planta es equivalente al 2.26%. Con respecto al rendimiento total obtenido para otras especies, Noriega-Cisneros en el 2012 y Castro-Torres en el 2017 reportaron un rendimiento del 1.27% y 1.1% respectivamente en la obtención de un extracto etanólico de *E. carlinae*, un ejemplar que pertenece al mismo género que nuestra planta de estudio. Sin embargo, como se puede constatar, yace una ligera variación, esto se debe, en parte, a que nuestro extracto contiene una mayor concentración de compuestos polares que se pueden extraer utilizando un solvente como el agua; en comparación con la cantidad y concentración de compuestos de menor polaridad que se pueden extraer empleando etanol como solvente de extracción (Noriega-Cisneros *et al.*, 2012; Castro-Torres *et al.*, 2017).

6.3 Ensayo de letalidad del extracto en el modelo de *Artemia* spp.

De acuerdo con los ensayos estadísticos (con un intervalo de confianza de 95%), el valor de la concentración letal media (CL_{50}) para el extracto acuoso de *Eryngium alternatum* es de 481 $\mu\text{g/ml}$. Con base o a los rangos de toxicidad recomendados por el CYTED (1995), el extracto es considerado como “moderadamente tóxico” ya que presenta valores situados entre 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Dicho rango de toxicidad posteriormente se corroboró con los resultados observados en el modelo animal. Sin embargo, otros estudios en donde se ha empleado el modelo de *Artemia* spp., y extractos acuosos de plantas pertenecientes al mismo género, se ha puesto en evidencia los diversos escenarios de toxicidad que pueden tener éstas plantas, por ejemplo, González & Ernestina en el 2018 empleando el extracto acuoso de *Eryngium heterophyllum* sugirieron que la planta se puede clasificar como un ejemplar moderadamente tóxico al encontrarse una CL_{50} de 370 $\mu\text{g/ml}$, mientras que Micheloni y colaboradores en el mismo año ponen de manifiesto la inocuidad que puede presentar el extracto acuoso de *Eryngium horridum*. Bajo esta premisa, sugerimos la realización de otras pruebas de toxicidad en otros modelos de estudio para corroborar los hallazgos encontrados frente al modelo de *Artemia* spp., y frente al modelo de rata para el extracto acuosos de *Eryngium alternatum*.

6.4 Evaluación de la actividad antioxidante

De acuerdo con los resultados obtenidos por el método DDPH, el extracto no posee la capacidad para eliminar radicales libres de forma eficiente, de hecho, por los resultados obtenidos se observó un efecto menos eficiente el cual es dependiente de la concentración. En la siguiente gráfica se ilustra el efecto mediado por la concentración del extracto y su comparación con el ácido ascórbico empleado como control positivo. Cómo se puede apreciar, el menor efecto (depuración de radicales) se presentó a la concentración de 0.46 mg/ml (-4.8%), mientras que, a la mínima concentración empleada (0.016 mg/ml) se reportó el mayor efecto antioxidante (71.8 %), (Figura 1). Otras investigaciones empleando el extracto acuoso de *Eryngium horridum* (Micheloni *et al.*, 2018) reportaron que el extracto acuoso de dicha planta posee una actividad antioxidante del 67% (máxima actividad depuradora), que aunque no es despreciable, no se compara con el efecto que puede inducir el ácido ascórbico.

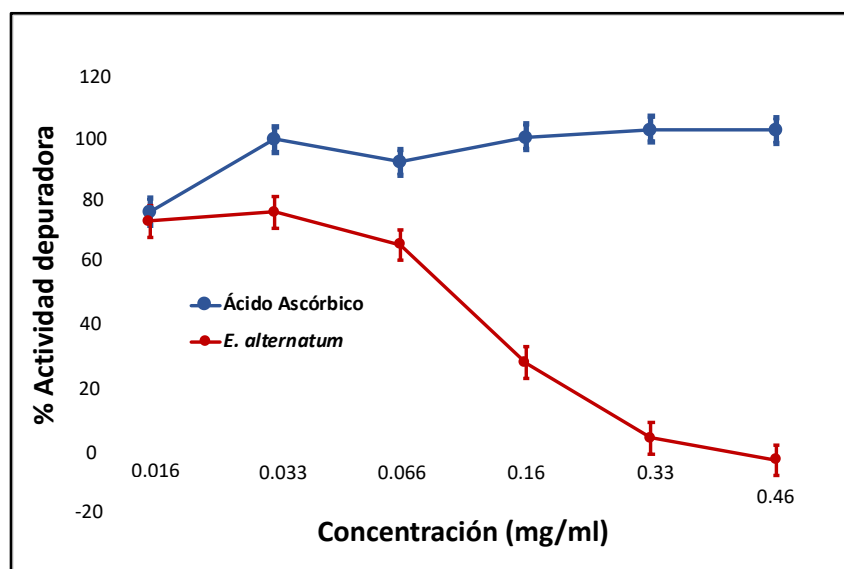


Figura 1. Actividad antioxidante. Actividad antioxidante del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* frente al control positivo (ácido ascórbico).

6.5 Evaluación de la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de *Eryngium alternatum* en ratas tratadas con fructosa

6.5.1 Evolución de peso

Se registró semanalmente la evolución del peso durante el periodo experimental (6 semanas). El peso incrementó de forma gradual para los tres grupos estudiados, sin embargo, el grupo Fructosa+Extracto presentó una media de peso menor en comparación con el grupo tratado con Fructosa. Incluso, en la semana 5 del experimento, la disminución de peso para el grupo Fructosa+Extracto fue significativa con respecto al grupo Control (Figura 2).

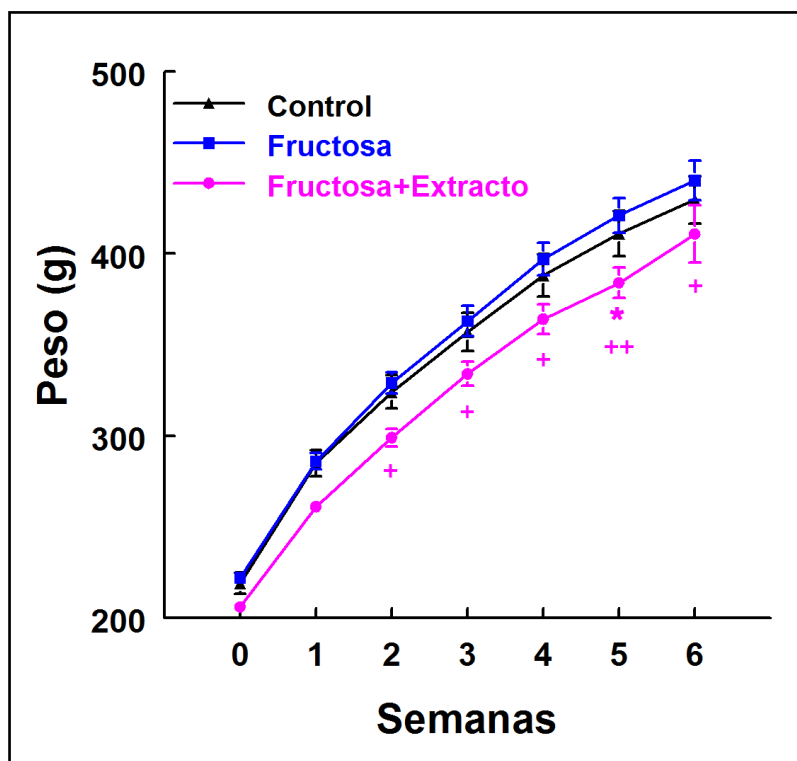


Figura 2. Evolución de peso en los grupos Control, Fructosa y Fructosa+Extracto durante las 6 semanas del estudio.
(n = 8 en cada grupo)

6.5.2 Ingesta de bebida y fructosa

De acuerdo con los resultados obtenidos ($p < 0.001$ vs Control) se determinó una diferencia significativa entre los grupos Fructosa y Fructosa+Extracto con respecto al grupo control en la ingesta de bebida, sin embargo, entre los grupos Fructosa y Fructosa+Extracto no se reportaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que se asume que la diferencia de peso estaba dada por el efecto de la administración de *E. alternatum* y no por la cantidad de fructosa o líquido. Tampoco se observaron diferencias significativas entre la ingesta de fructosa en los dos grupos tratados (Tabla 1).

Semana 5	Control	Fructosa	Fructosa+Extracto
Bebida (ml/rata/día)	35 ± 2	$156 \pm 8^*$	$151 \pm 9^*$
Bebida (ml/día/100g)	9 ± 1	$37 \pm 2^*$	$39 \pm 2^*$
Ingesta de fructosa (g/rata/día)	0	16 ± 1	15 ± 1
Ingesta de fructosa (g/100g/día)	0	3.7 ± 0.2	3.9 ± 0.2

Tabla 1. Ingesta de bebida y fructosa en los grupos experimentales en la semana 5 del estudio (n = 8 en cada grupo).

6.5.3 Variables morfológicas

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos. Por lo que se dedujo que la administración de los tratamientos con fructosa y con el extracto no incrementan o disminuyen el peso de dichos órganos, cómo se puede observar en la siguiente tabla (Tabla 2).

Sin embargo, en el 2014, Yang y colaboradores, en uno de sus trabajos empleando el mismo modelo animal pero con un extracto de jengibre reportaron una disminución del peso renal en el caso del grupo tratado con fructosa, y al igual que nosotros, tampoco reportaron cambios referentes al peso corporal para ambos grupos experimentales.

	PC (g)	PC/Peso (mg/g)	PR (g)	PR/Peso (mg/g)
Control	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Fructosa	1.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1	3 ± 0.1
Fructosa+Extracto	1.2 ± 0.1	2.9 ± 0.2	1.2 ± 0.1	3 ± 0.1

Tabla 2. Peso del riñón (PR), peso del corazón (PC), ratio PR/Peso y ratio PC/Peso al final del estudio en los tres grupos experimentales (n = 8 en cada grupo).

6.5.4 Análisis de parámetros bioquímicos

6.5.4.1 Urea, creatinina y glucosa plasmáticas

Se analizaron los parámetros bioquímicos de las muestras plasmáticas para la determinación de urea, creatinina y glucosa. Con respecto a los niveles de urea (Figura 3a), se observó un incremento mayor en el grupo Fructosa+Extracto, la diferencia fue significativa con respecto al grupo Fructosa ($p<0.001$) y al grupo Control ($p<0.001$).

Los niveles de creatinina incrementaron en los grupos Fructosa ($p<0.05$) y Fructosa+Extracto ($p<0.01$), estos incrementos fueron significativos con respecto al grupo Control (Figura 3b). Sin embargo, estas variables no presentaron diferencias significativas entre el grupo Fructosa y el grupo Fructosa+Extracto. Finalmente, las diferencias obtenidas en la medición de glucosa no fueron significativas en ninguno de los tres grupos experimentales (Figura 3c).

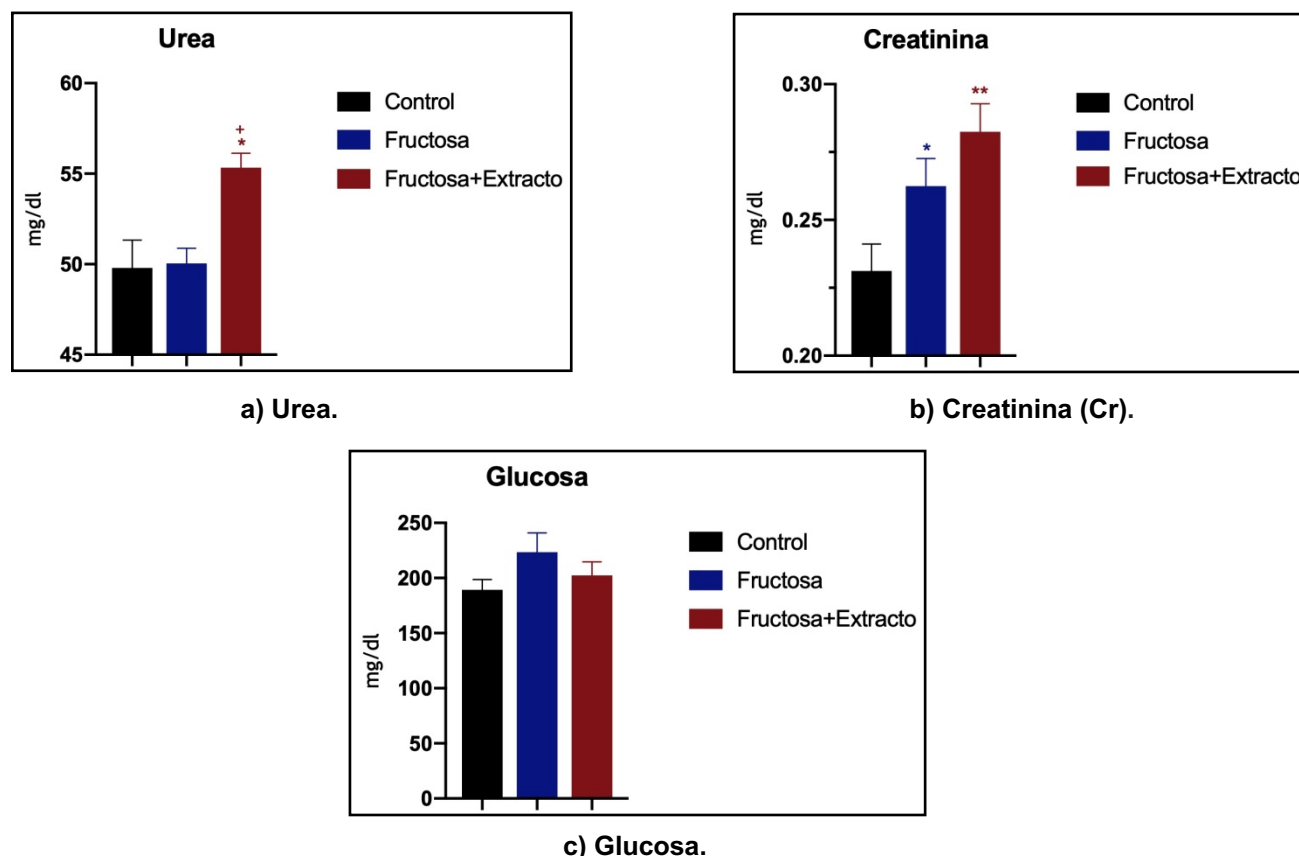


Figura 3. Concentración plasmática de: urea (a), creatinina (b) y glucosa (c) al final del estudio en los grupos Control, Fructosa y Fructosa+Extracto (n = 8 en cada grupo).

De acuerdo con nuestros resultados y los reportados en 2014 por Yang y colaboradores respecto al mismo animal con síndrome metabólico inducido por la ingesta de fructosa, estos autores encontraron que la concentración de glucosa y los niveles de urea en plasma permanecieron sin cambios en el grupo tratado con fructosa. En nuestro estudio tampoco hemos encontrado diferencias significativas en estos mismos parámetros. Sin embargo, hemos encontrado discrepancias en los resultados obtenidos para la determinación de los niveles de creatinina en plasma, ya que, en nuestro caso, se reportó un incremento significativo para este parámetro en comparación con el grupo control, indicando la presencia de disfunción renal en el grupo tratado con fructosa. Una posible explicación para esta discrepancia es el hecho de que en nuestro estudio tuvo una duración mayor que el de estos autores, ya que duró 6 semanas mientras que el de Yang *et al.*, tuvo una duración menor (5 semanas).

6.5.4.2 Actividad aminopeptidásica (GluAp y AlaAp) en plasma

Se analizaron los parámetros bioquímicos de las muestras plasmáticas para la determinación de la actividad aminopeptidásica de las enzimas GluAp y AlaAp. Para ambos casos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres grupos experimentales (Figura 4a y 4b).

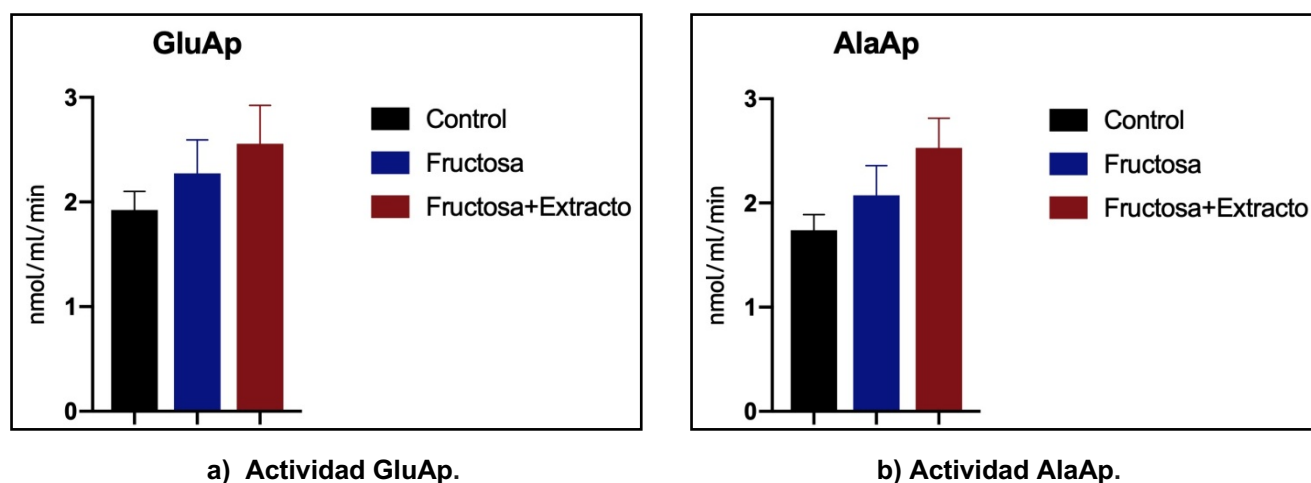


Figura 4. Actividad plasmática de GluAp y AlaAp al final del estudio en los grupos Control, Fructosa y Fructosa+Extracto (n = 8 en cada grupo).

6.5.4.3 Parámetros urinarios

Para la realización del estudio metabólico no se añadió fructosa en el agua de bebida a ninguno de los grupos experimentales con el objetivo, por un lado, de facilitar la recogida de la muestra de orina y, por otro lado, posibilitar la determinación en orina de los distintos parámetros ya que el aumento en la diuresis en estos animales daría lugar a una dilución exagerada de la muestra (Nakayama *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014). Esta dilución podría dar lugar a que las muestras obtenidas se encontraran por debajo de la sensibilidad de los métodos analíticos utilizados. Los efectos a nivel renal se producen mediante la administración crónica de estos tratamientos, por lo que la interrupción temporal de los mismos durante 24 h no debe tener mayores consecuencias sobre los distintos parámetros a analizar (Quesada *et al.*, 2012 & 2017). Adicionalmente, mediante esta metodología, evitamos el posible efecto agudo que pudiera producir la ingesta de fructosa y/o del extracto sobre estos parámetros.

Se analizaron los parámetros bioquímicos de las muestras urinarias para la determinación de la actividad aminopeptidásica de las enzimas GluAp y AlaAp, así como para la determinación de los parámetros clásicos de glucosuria y proteinuria.

Para el caso de los niveles de glucosa (Figura 5a) y proteína (Figura 5b) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, para el caso de la actividad enzimática GluAp (Figura 5c) y AlaAp (Figura 5d) si se reportaron incrementos significativos para el grupo Fructosa ($p < 0.01$) y Fructosa+Extracto ($p < 0.001$) en comparación con el grupo control. Por esta razón, se puede descartar que el aumento de la actividad enzimática urinaria se deba a un aumento en la actividad sistémica de las mismas (ya que previamente se evidenció que la actividad enzimática de GluAp y AlaAp no incrementó en las muestras plasmáticas), confirmando que la presencia de estas enzimas en la orina tiene un origen renal como se ha sugerido en otros trabajos previos (Quesada *et al.*, 2012).

Como se confirmó en este estudio, y en otros trabajos previos en el laboratorio (Quesada *et al.*, 2012; Montoro Molina *et al.*, 2018), la medición de la proteinuria no proporciona

información real ante un evento de lesión renal, por lo que su determinación no es un parámetro de gran utilidad, al menos, en las primeras etapas de la enfermedad renal crónica. Y bajo esta evidencia, es de vital importancia el desarrollo e implementación de nuevos métodos de diagnóstico que puedan proporcionar información precisa sobre un proceso de lesión renal e incluso proporcionar datos sobre el lugar en donde yace dicha lesión. Por esta razón, el ensayo de la actividad aminopeptidásica (GluAp y AlaAp) se sugiere como un método novedoso que se podría implementar en los ensayos clínicos para refutar o confirmar una lesión renal que se desarrolla en las primeras etapas de la enfermedad renal crónica, donde la tasa de filtrado glomerular se muestra normal o ligeramente disminuida, ya que a través de los métodos tradicionales resulta difícil confirmarlo.

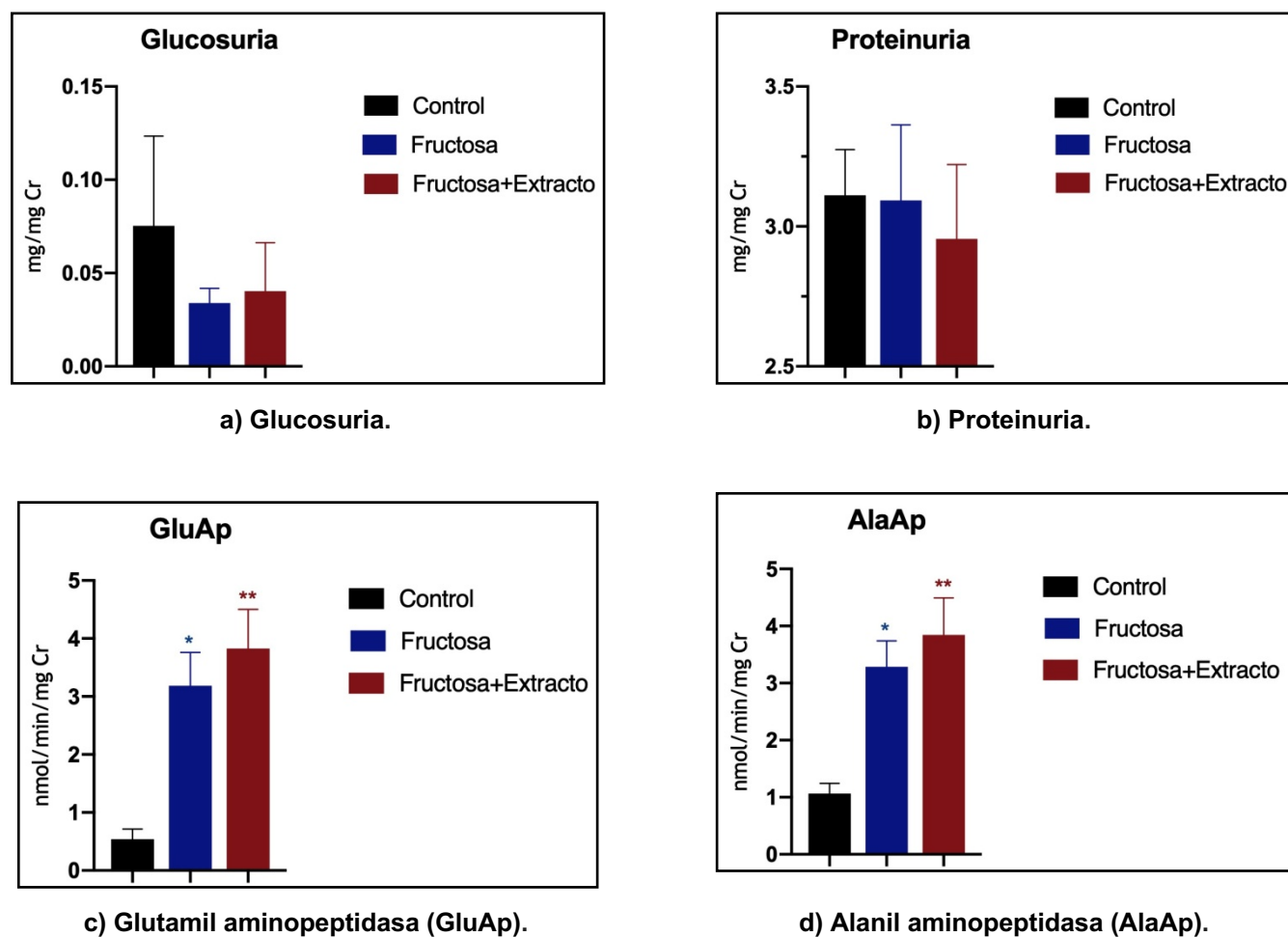


Figura 5. Glucosuria (a), proteinuria (b), actividad urinaria de GluAp (c) y actividad urinaria de AlaAp (d) al final del estudio en los grupos Control Fructosa y Fructosa+Extracto (n = 8 en cada grupo).

6.5.4.4 Aclaramiento de creatinina

Con base en los niveles de creatinina obtenidos de las muestras plasmáticas se procedió al cálculo del aclaramiento de creatinina (Figura 6). Como se puede observar en la siguiente gráfica. El aclaramiento disminuyó en el grupo Fructosa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Control. Y para el caso del grupo Fructosa+Extracto se reportaron niveles aún más bajos que los reportados para el grupo al que se le trató con fructosa al 10%. La disminución en el aclaramiento de creatinina para este grupo experimental fue significativa con respecto al grupo Fructosa ($p < 0.001$) y al grupo Control ($p < 0.001$).

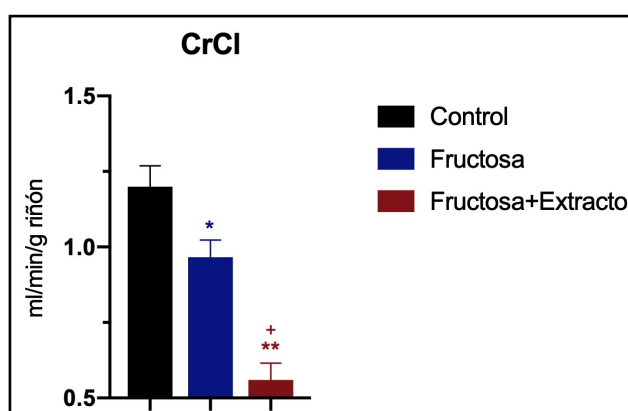


Figura 6. Aclaramiento de creatinina (CrCl) al final del estudio en los tres grupos experimentales (n = 8 en cada grupo).

6.5.4.5 Correlación entre marcadores urinarios y creatinina

Se obtuvieron correlaciones significativas con la concentración de creatinina plasmática para el caso de las actividades enzimáticas de GluAp y AlaAp en orina, esto significa que mientras mayor sea la cantidad de creatinina en plasma también se presentará una mayor actividad enzimática de GluAp y AlaAp (en muestras de orina), sin embargo, no se obtuvo correlación significativa para el caso de la proteinuria con la concentración de creatinina (Figura 7).

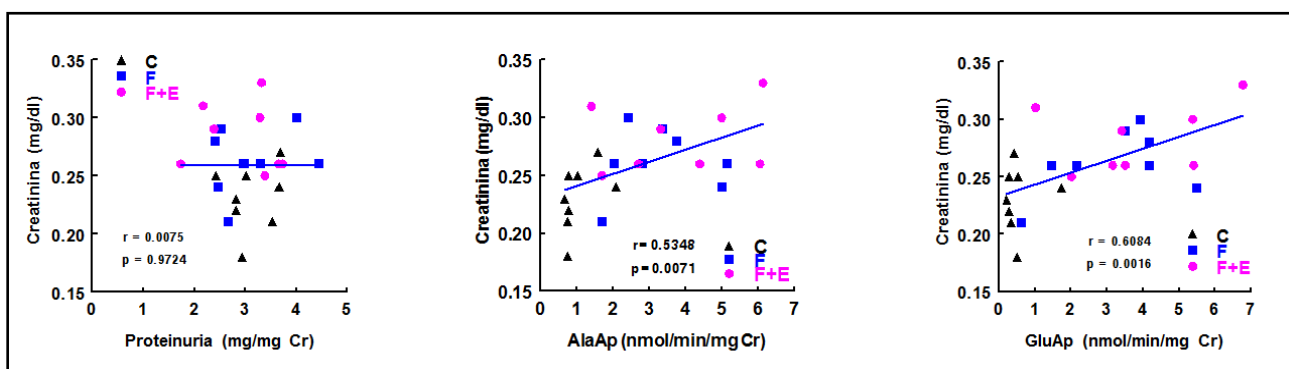


Figura 7. Correlación entre proteinuria (izquierda), AlaAp (centro) y GluAp (derecha) y la concentración de creatinina en plasma.

6.5.4.6 Correlación entre marcadores urinarios y aclaramiento de creatinina

Haciendo una correlación de la actividad enzimática con el aclaramiento de creatinina, hemos observado que cuanto mayor es el incremento en la actividad enzimática de las enzimas urinarias GluAp y AlaAp menor es la tasa de filtrado glomerular del animal, independientemente del tratamiento recibido, sin embargo, no se obtuvo una correlación significativa para el caso de la proteinuria. Dados estos resultados, hemos sugerimos el estudio de la actividad aminopeptidásica como un método con potencial utilidad en el diagnóstico de la enfermedad renal crónica (ERC), ya que otros marcadores urinarios tradicionales como la proteinuria no guardan relación ni con las lesiones renales ni con la tasa de filtración glomerular. Además, en el laboratorio, se ha reportado que estos marcadores urinarios han mostrado eficiencia en el diagnóstico de daño renal en otras patologías como es el caso de la disfunción renal mediada por fármacos antineoplásicos como el cis-platino (Quesada *et al.*, 2012; Montoro-Molina *et al.*, 2018) o en la enfermedad renal crónica asociada al modelo experimental de ratas Zucker obesas (Montoro-Molina *et al.*, 2018).

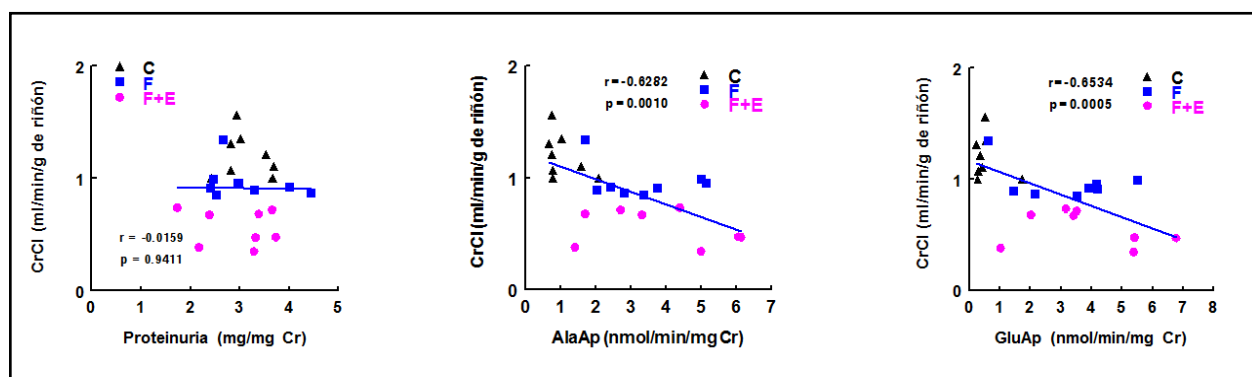


Figura 8. Correlación entre proteinuria (izquierda), AlaAp (centro) y GluAp (derecha) y el aclaramiento de creatinina en plasma.

6.6 Histopatología

En el tejido renal se observaron lesiones similares en el grupo Fructosa y en el grupo Fructosa+Extracto, consistentes en necrosis tubular focal y descamación de células tubulares (Fig. 9). Sin embargo, no se observaron signos de inducción de fibrosis ni se observó la presencia de infiltrado inflamatorio en ninguno de los dos casos.

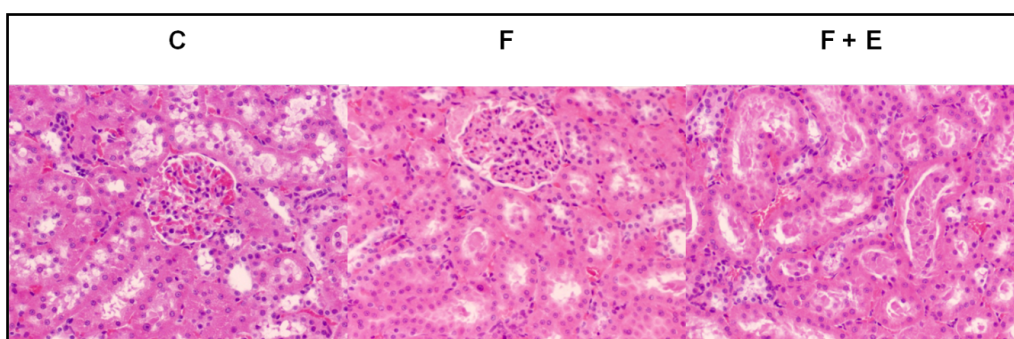


Figura 9. Tinción HE de tejido renal. Necrosis tubular localizada y descamación de células tubulares en el grupo Fructosa (F) y Fructosa+Extracto (F+E).

En el hígado (Figura 10) y en el páncreas (Figura 11) del grupo Fructosa+Extracto se observó lesión aguda reversible (esteatosis mixta microvesicular y macrovesicular) e incluso algo de infiltrado inflamatorio con fenómenos de apoptosis de hepatocitos en el caso del hígado. Sin embargo, en el grupo Fructosa no aparece esteatosis hepática, aunque sí se observan focos de infiltrado inflamatorio intralobulillar de pequeña entidad (Figura 10). El tratamiento con fructosa no afectó a la histopatología del tejido pancreático que era similar al grupo Control (Figura 11).

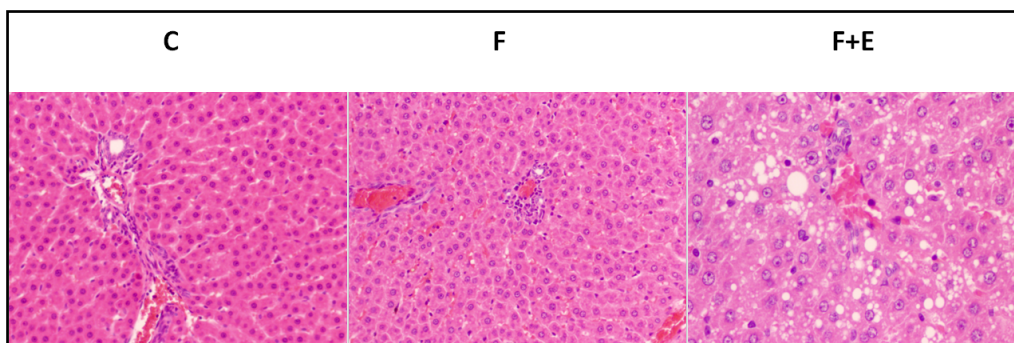


Figura 10. Tinción HE de tejido hepático del grupo Control (C), Fructosa (F) y Fructosa+Extracto (F+E). Lesión aguda reversible e infiltrado inflamatorio en el grupo F+E.

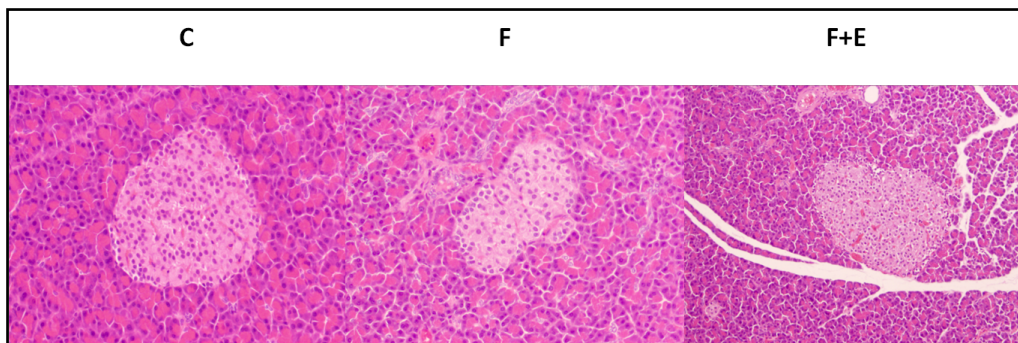


Figura 11. Tinción HE de tejido pancreático del grupo Control (C), Fructosa (F) y Fructosa+Extracto (F+E). Lesión aguda reversible e infiltrado inflamatorio en el grupo F+E.

En los estudios histopatológicos Yang y colaboradores en el 2014., y Nakagawa y colaboradores en el 2006 encontraron necrosis tubular localizada, así como desprendimiento y dilatación de células epiteliales tubulares, coincidiendo con los hallazgos de nuestro estudio en cuanto a histopatología renal.

7. Conclusiones

El resultado más relevante del estudio es que el extracto acuoso de *Eryngium alternatum* no desempeña una función nefroprotectora en el modelo animal de daño renal inducido por la ingesta en exceso de fructosa. De hecho se observó que en lugar de funcionar como adyuvante de la disfunción renal, éste agrava a dicha enfermedad; ya que disminuye la tasa de filtración glomerular (determinada mediante el aclaramiento de creatinina) y además aumenta la concentración plasmática de urea en las ratas tratadas con el extracto, en comparación con las ratas tratadas únicamente con fructosa al 10%.

Sobre la misma línea, los resultados sugieren que el extracto provoca una disminución en el peso corporal de los animales y que genera alteraciones histopatológicas evidentes en el tejido hepático y pancreático, aspectos que confirman la toxicidad de este, y que además se relacionan con los datos obtenidos por el ensayo de letalidad en el modelo de *Artemia* spp.

Con relación a las aminopeptidasas urinarias, se demostró su funcionalidad como biomarcadores tempranos (no invasivos) de las lesiones tubulares y de la disfunción renal presentes en este modelo experimental. Además, mediante otros trabajos llevados a cabo en el laboratorio, se ha podido demostrar que las aminopeptidasas también resultan eficientes como método de diagnóstico para otras patologías renales como pueden ser la enfermedad renal aguda inducida por la administración de cisplatino (agente quimioterapéutico empleado para el tratamiento de varios tipos de cáncer) y la enfermedad renal crónica inducida por un cuadro de obesidad.

Sobre los ensayos de CL₅₀ en el modelo de *Artemia* spp., se reportó que la planta al ser administrada mediante la decocción al 2% presenta niveles moderadamente tóxicos, éstos efectos de la toxicidad se vieron reflejados en el modelo murino, sin embargo, para confirmar nuestras hipótesis, se sugiere la comprobación de dichos hallazgos mediante otras pruebas de letalidad o toxicidad; como pueden ser los cultivos de líneas celulares, e incluso, ensayos en cultivos bacterianos que puedan dar una sorpresiva utilidad para el tratamiento por infecciones de esta naturaleza.

Respecto a los ensayos de actividad depuradora mediante el empleo del radical DPPH, se necesitan realizar más estudios de esta naturaleza que nos puedan ayudar a comprender el mecanismo por el cual el extracto no desempeña óptima capacidad antioxidante, y posiblemente se pueda relacionar con el daño renal observado en el modelo animal al que se le administró el extracto. Retomando la última propuesta, y si las diversas pruebas de actividad antioxidante lo confirman, el extracto se podría considerar como un prospecto para el tratamiento de infecciones mediadas por bacterias, siempre y cuando se pueda identificar el compuesto activo causante de los procesos de citotoxicidad.

8. Recomendaciones

No descartamos la posibilidad de que la decocción de *E. alternatum* posea algún componente que de manera aislada pueda desempeñar una función beneficiosa que pueda servir como adyuvante para el tratamiento de la enfermedad renal crónica, sin embargo, para poder confirmar dicha hipótesis se requieren de otros modelos o pruebas *in vivo* que confirmen su utilidad, y en el supuesto en el que se observe algún beneficio o perjuicio, proponer ciertas moléculas mediante estudios cromatográficos y espectroscópicos que nos puedan orientar hacia dicha causa.

Por otra parte, y de acuerdo con los primeros resultados en donde el extracto resultó ser citotóxico, se sugiere su estudio como una propuesta para otras áreas experimentales que involucren enfermedades de otra naturaleza, como pueden ser las infecciones mediadas por agentes bacterianos o fúngicos, incluso, suena factible su estudio como un posible candidato para el desarrollo de un biopesticida de origen natural que sea compatible con los cultivos que desarrollan en la región, al mismo tiempo en el que se cuida la integridad de la tierra.

9. Referencias

Abramovič, H., Grobin, B., Ulrih, N. P., & Cigić, B. (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu assays has a large influence on the determined anti-oxidant potential. *Acta Chimica Slovenica*, 64(2), 491-499.

Al-Naimi, M. S., Rasheed, H. A., Hussien, N. R., Al-Kuraishy, H. M., & Al-Gareeb, A. I. (2019). Nephrotoxicity: Role and significance of renal biomarkers in the early detection of acute renal injury. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 10(3), 95.

Aleixandre, A., & Miguel, M. (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. *Endocrinología y Nutrición*, 55(5), 217-222.

Arcanjo, D. D. R., Albuquerque, A. C. M., Melo-Neto, B., Santana, L. C. L. R., Medeiros, M., & Citó, A. M. G. L. (2012). Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*. Vol. 72, pp. 505-509.

Arredondo, A. (2001). Requerimientos financieros para la demanda de servicios de salud por diabetes e hipertensión en México: 2001-2003. *La Revista de Investigación Clínica*. Vol. 53, pp 422-429.

Arthur, M. (2014). Institute for Health Metrics and Evaluation. *Nursing Standard*. Vol. 28, pp. 32.

Ayala, I., Cámara, P., & Fernández-Pardo, J. (2008). Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. In *Anales de veterinaria de Murcia* (Vol. 24).

Babbar, N., Oberoi, H. S., & Sandhu, S. K. (2015). Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 319-337.

Bullón, P. P., Gómez, I. M. A., & Clemente, P. S. (2018). La importancia de los cuidados de enfermería para los pacientes trasplantados de riñón en España. *Salud y cuidados durante el desarrollo*. Vol II, pp. 117-124.

Bonventre J.V., Vaidya V.S., Schmouder R., Feig P., & Dieterle F. (2010) Biomarcadores de próxima generación para la detección de toxicidad renal. *Nat Biotechnol*. Vol. 28, pp. 436–440.

Büchi. (2016). Manual de instrucciones. Rotavapor R-220 SE. Septiembre, 2019, de Büchi Labortechnik AG Sitio web: http://static2.buchi.com/sites/default/files/downloads/11593360_R-220SE_OM_es_F_LR.pdf

Calvino, C. I., Martínez, S. G., & Downie, S. R. (2008). The evolutionary history of Eryngium (Apiaceae, Saniculoideae): Rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. *Molecular phylogenetics and evolution*. Vol 46, pp.1129-1150.

Campos Gutiérrez, B., Lou Arnal, L. M., Gimeno Orna, J. A., Gracia García, O., Cuberes Izquierdo, M., Turón Alcaine, J. M., & Sanjuán, A. (2011). La enfermedad renal que se oculta tras los ingresos: una oportunidad de mejora. *Nefrología (Madrid)*. Vol. 31(1), 70-75.

Carracedo, A. G., & Muñana, E. A. (2012). Insuficiencia renal crónica. *Química. Es*, pp. 637-646.

Castillo García, E. (2007). Manual de fitoterapia, Encarna Castillo García, Isabel Martínez Solís.

Castro-Torres, I. G., la O-Arciniega, D., Naranjo-Rodríguez, E. B., Castro-Torres, V. A., Domínguez-Ortíz, M. Á., & Martínez-Vázquez, M. (2017). The hypocholesterolemic effects of *Eryngium carlinae* F. Delaroche are mediated by the involvement of the intestinal transporters ABCG5 and ABCG8. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

Chen, J., Muntner, P., Hamm, L. L., Jones, D. W., Batuman, V., Fonseca, V., & He, J. (2004). The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Annals of internal medicine*. Vol. 140, pp. 167-174.

Chifa, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 9(4), 242-245.

Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2016). *Reporte de la biodiversidad en México*.

Cortés-Sanabria, L., Álvarez-Santana, G., Orozco-González, C. N., Soto-Molina, H., Martínez-Ramírez, H. R., & Cueto-Manzano, A. M. (2017). Economic impact of the chronic kidney disease: Perspective of the Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Vol. 55, pp. 124.

Dar, R. A., Brahman, P. K., Khurana, N., Wagay, J. A., Lone, Z. A., Ganaie, M. A., & Pitre, K. S. (2017). Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1119-S1128.

Darriet, F., Andreani, S., De Cian, M. C., Costa, J., & Muselli, A. (2014). Chemical variability and antioxidant activity of *Eryngium maritimum* L. essential oils from Corsica and Sardinia. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 29, pp. 3-13.

Devarajan P (2007) Biomarcadores emergentes de lesión renal aguda. *Contrib Nephrol* Vol. 156, pp. 203–212.

Durán, A. M., & Rivera, G. R. (2017). *Nefrología para enfermeros*. Ed. El Manual Moderno.

Elliott, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K., & Havel, P. J. (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American journal of clinical nutrition*. Vol. 76, pp. 911-922.

Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1989). Las plantas medicinales en la terapéutica.

Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sario Ramos, I., Acuña Rodríguez, D., & Gutiérrez Gaitén, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.

Finney, D. J. (1971). Probit analysis, 3rd edn Cambridge. UK: University Printing House.

Flores, J. C., Alvo, M., Borja, H., Morales, J., Vega, J., Zúñiga, C., & Münzenmayer, J. (2009). Enfermedad renal crónica: Clasificación, identificación, manejo y complicaciones. *Revista médica de Chile*. Vol. 37 pp. 137-177.

Fonnegra, F. G. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia.

Fujita, Y., Mori, I., & Kitano, S. (1983). Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku*. Vol. 32, pp.379-386.

Gao, H., Guan, T., Li, C., Zuo, G., Yamahara, J., Wang, J., & Li, Y. (2012). Treatment with ginger ameliorates fructose-induced Fatty liver and hypertriglyceridemia in rats: modulation of the hepatic carbohydrate response element-binding protein-mediated pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

García Bacallao, L., Rojo Domínguez, D. M., García Gómez, L. V., & Hernández Ángel, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 214-216.

García-Ruiz, I. (2013). Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. *Acta botánica mexicana*. Vol. (103), pp.65-118.

Gonzales, J. C. H., & Saavedra, E. G. (2019). Evaluación de la actividad antioxidante en la infusión filtrante de las hojas de almendro de las indias (*Terminalia catappa* L.) por el método DPPH in vitro, en tres temperaturas de deshidratación. *Investigación Universitaria*, 8(2), 58-74.

González Yáñez, M., & Ernestina, G. (2018). Efecto tóxico *in vivo* e *in vitro* de los extractos polares de nueve plantas utilizadas en medicina tradicional (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Grilo, N., & Schurch, B. (2019). Renal Function Evaluation 21. *Neurourology: Theory and Practice*. Vol. 195.

Grimm Jr, R. H., Svendsen, K. H., Kasiske, B., Keane, W. F., & Wahl, M. M. (1997). Proteinuria is a risk factor for mortality over 10 years of follow-up. *Kidney International Supplement*. Vol. 63.

Grossfeld, G. D., Wolf Jr, J. S., Litwin, M. S., Hricak, H., Shuler, C. L., Agerter, D. C., & Carroll, P. R. (2001). Asymptomatic microscopic hematuria in adults: summary of the AUA best practice policy recommendations. *American family physician*. Vol. 63.

Haneda, M., Utsunomiya, K., Koya, D., Babazono, T., Moriya, T., Makino, H., & Inaba, M. (2015). A new classification of diabetic nephropathy 2014: a report from joint committee on diabetic nephropathy. *Journal of diabetes investigation*. Vol. 6, pp. 242-246.

Hara, K., Someya, T., Sano, K., Sagane, Y., Watanabe, T., & Wijesekara, R. (2018). Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data in brief*. Vol. 17, pp. 870-875.

He, L., Qi, Y., Rong, X., Jiang, J., Yang, Q., Yamahara, J., & Li, Y. (2011). The Ayurvedic medicine *Salacia oblonga* attenuates diabetic renal fibrosis in rats: suppression of angiotensin II/AT1 signaling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Heinegård, D., & Tiderström, G. (1973). Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clinica chimica acta*. Vol. 43, pp. 305-310.

Heywood, V. H., Moore, D. M., Richardson, I. B. K., & Stearn, W. T. (1993). *Flowering plants of the world*. Oxford university press. Vol. 582 p.644

Irigoyen Coria, A. E., Ayala Cortés, A., Ramírez de la Roche, O. F., & Calzada Hernández, E. (2017). Diabetes Mellitus and its Social and Clinical Implications in Mexico and Latin America. *Archivos en Medicina Familiar*. Vol. 19, pp. 91-94.

Jacobson, M. F. (2004). High-fructose corn syrup and the obesity epidemic. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 80, pp. 1081-1081.

Juarez Rosete, C. R., Aguilar Castillo, J. A., Juarez Rosete, M. E., Bugarin Montoya, R., Juarez Lopez, P., & Cruz Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e innovación.

Jürgens, H., Haass, W., Castaneda, T. R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., & Ristow, M. (2005). Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity research*. Vol. 13, pp. 1146-1156.

Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., & He, J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The lancet*. Vol. 365, pp. 217-223.

Kholkhal, W., Ilias, F., Bekhechi, C., & Bekkara, F. A. (2012). *Eryngium maritimum*: A rich medicinal plant of polyphenols and flavonoids compounds with antioxidant, antibacterial and antifungal activities. *Current Research Journal of Biological Sciences*. Vol. 4, pp. 437-443.

Kok, N., Roberfroid, M., & Delzenne, N. (1996). Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 45(12), 1547-1550.

Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega.

Kurella, M., Lo, J. C., & Chertow, G. M. (2005). Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *Journal of the American Society of Nephrology*, Vol. 16, pp. 2134-2140.

Leonora, S. G. F. F. (2015). Fundamentos de Fitoquímica Experimental.

Levey, A. S., Becker, C., & Inker, L. A. (2015). Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *Jama*, Vol. 313, pp. 837-846.

Levey, A. S., Coresh, J., Bolton, K., Culeton, B., Harvey, K. S., Ikizler, T. A., & Levin, A. (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American Journal of Kidney Diseases*. Vol. 39.

Li, Y., Qi, Y., Kim, M. S., Xu, K. Z. Y., Huang, T. H. W., Rong, X., & Yamahara, J. (2008). Increased renal collagen cross-linking and lipid accumulation in nephropathy of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes/metabolism research and reviews*. Vol. 24, pp. 498-506.

Lisciani, R., Fattorusso, E., Surano, V., Cozzolino, S., Giannattasio, M., & Sorrentino, L. (1984). Anti-inflammatory activity of *Eryngium maritimum* L. rhizome extracts in intact rats. *Journal of ethnopharmacology*. Vol. 12, pp. 263-270.

Liu, C., Li, Y., Zuo, G., Xu, W., Gao, H., Yang, Y., & Li, Y. (2013). Oleanolic acid diminishes liquid fructose-induced fatty liver in rats: role of modulation of hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c-mediated expression of genes responsible for de novo fatty acid synthesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Lojda, Z., & Gossrau, R. (1980). Study on aminopeptidase A. *Histochemistry*, 67(3), 267-290.

Loredo, J. P., Lavorato, C. A., & Negri, A. L. (2017). Tasa de filtración glomerular medida y estimada. Numerosos métodos de medición (Parte I). *Revista de Nefrología, Diálisis y Trasplante*. Vol. 35, pp.153-164.

Mabberley, D. J. (1997). The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge university press.

Mariscal-Ramírez, L. A., Alberú-Gómez, J. M., Amato-Martínez, J. D., Bochicchio-Ricardelli, T., Campos-González, I. D., Cervera-Saldaña, V. R., ... & Muñoz-Arizpe, R. (2019). Edulcorantes no calóricos y enfermedad renal: análisis de la evidencia.

Márquez Hernández, I., Bastidas Guerrero, T. L., Fernández Valarezo, G. K., Campo Fernández, M., Jaramillo Jaramillo, C. G., & Rojas de Astudillo, L. (2017). Preliminary pharmacognostic study of the stem and root of the species *Moringa Oleifera* lam grown in Machala. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-13.

Márquez, Y., Echenique, K., & Camacho, A. (2018). Estilos de vida no saludables que inciden en la aparición de la enfermedad renal crónica.

Martínez-Castelao, A., Górriz, J. L., Bover, J., Segura-de la Morena, J., Cebollada, J., Escalada, J., & Hernández-Moreno, J. (2014). Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Endocrinología y Nutrición*. Vol. 61, pp. 25-43.

Martínez Pérez, D., Pérez de Alejo Rodríguez, L., Moré Chang, C. X., Rodríguez Viera, R., & Dupuy Nuñez, J. C. (2016). Estudios de laboratorio clínico para la detección de la enfermedad renal crónica en grupos poblacionales de riesgo. *MediSan*. Vol. 20, pp. 49-58.

Mejía, M. C. C., Olascoaga, L. W., Pérez, S. M., & Tapia, F. H. (2017). Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*, 56(2), 26-47.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. J., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*. Vol. 45, pp. 31-34.

Michael, A. S., Thompson, C. G., & Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*, 123(3194), 464-464.

Micheloni, O. B., González, E., Leclercq, B., Rollandeli, G., Oackley, L., & Farroni, A. E. (2018). Estudio de la actividad biológica y toxicidad de extractos naturales obtenidos a partir de especies vegetales silvestres.

Mikusic, N. L. R., Kouyoumdzian, N. M., Del Mauro, J. S., Gironacci, M. M., Puyó, A., Toblli, J. E., & Choi, M. R. (2018). La alteración de sistemas natriuréticos renales se asocia con el desarrollo de hipertensión arterial y precede en el tiempo a la aparición de daño renal en un modelo de síndrome metabólico. *Revista argentina de cardiología*, 86(1), 8-14.

Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.

the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m². *American Journal of Kidney Diseases*. Vol. 56, pp. 486-495.

Montoro-Molina, S., López-Carmona, A., Quesada, A., O'Valle, F., Martín-Morales, N., Osuna, A., & Wangenstein, R. (2018). Klotho and aminopeptidases as early biomarkers of renal injury in Zucker obese rats. *Frontiers in Physiology*. Vol. 9, p. 1599.

Moreno, J. A., Yuste, C., Gutiérrez, E., Sevillano, Á. M., Rubio-Navarro, A., Amaro-Villalobos, J. M., & Egido, J. (2016). Haematuria as a risk factor for chronic kidney disease progression in glomerular diseases: A review. *Pediatric nephrology*. Vol. 31, pp. 523-533.

Muñoz, O. (2001). Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología. Editorial Universitaria.

Nakagawa, T., Tuttle, K. R., Short, R. A., & Johnson, R. J. (2005). Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nature Reviews Nephrology*. Vol. 1, p. 80.

Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K. R., Short, R. A., Glushakova, O., & Patel, J. M. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. Vol. 290, pp. 625-631.

National Collaborating Centre for Chronic Conditions (Great Britain). (2008). Chronic kidney disease: national clinical guideline for early identification and management in adults in primary and secondary care. *Royal College of Physicians*.

Neli P. (2015). *Artemia salina*. Octubre 2019, de Crustanews Sitio web: <http://www.planeta-neli.es/index.php/2015/10/14/artemia-salina/>

Noriega-Cisneros, R., Ortiz-Avila, O., Esquivel-Gutiérrez, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Salgado-Garciglia, R., & Saavedra-Molina, A. (2012). Hypolipidemic activity of *eryngium carlinae* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemistry research international*.

del Olmo, R. A. (2016). Efecto renoprotector de los ARAs y la dieta hipocalórica en un modelo experimental de lesión renal precoz en ratas obesas y diabéticas (fa/fa) (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).

Oudot, C., Lajoix, A. D., Jover, B., & Rugale, C. (2013). Dietary sodium restriction prevents kidney damage in high fructose-fed rats. *Kidney international*, 83(4), 674-683.

Pandey, M., Govindarajan, R., Rawat, S., & Pushpangadan, P. (2005). Free radical scavenging potential of *Saussarea costus*. *Acta Pharmaceutica Zagreb*. Vol. 55, pp. 297.

Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395-400.

Pascual, I., García, G., Sánchez, L., & Díaz, L. (2015). Aminoamidase N from mammals: biochemical characteristics, physiological functions and implication in physiopathological processes in humans. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1), 2-16.

Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Moreno, J. A., Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2016). Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *Journal of functional foods*. Vol. 20, pp.545-555.

Pinzon, R y Sánchez C. (1995). Manual de Tecnicas de Investigación: CYTED. pp. 63-70.

Poortmans, J., & Jeanloz, R. W. (1968). Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise. *The Journal of clinical investigation*. Vol. 47, pp. 386-393.

Porras, A., & Álvarez, A. (2013). La medicina tradicional como un modelo de atención integral en salud. *Revista de la Universidad del Valle de Guatemala*, 25, 58-60.

Price III, J. A. (2016). An in vitro evaluation of the Native American ethnomedicinal plant *Eryngium yuccifolium* as a treatment for snakebite envenomation. *Journal of intercultural ethnopharmacology*. Vol. 5, pp. 219.

Quesada, P. L., Gallego, A. M. L., Reyes, M. V., Rojas, A. D. L., & Ramos, L. S. S. (2016). Caracterización de pacientes diabéticos con microalbuminuria. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*. Vol. 41.

Quesada, A., Vargas, F., Montoro-Molina, S., O'Valle, F., Rodríguez-Martínez, M. D., Osuna, A., & Wangenstein, R. (2012). Urinary aminoamidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PloS one*. Vol. 7(7).

Quesada, A., Segarra, A. B., Montoro-Molina, S., de Gracia, M. D. C., Osuna, A., O'Valle, F., & Wangenstein, R. (2017). Glutamyl aminopeptidase in microvesicular and exosomal fractions of urine is related with renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PloS one*. Vol. 12(4).

Quiroga, B., Rodríguez-Palomares, J. R., & De Arriba, G. (2015). Insuficiencia renal crónica. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. Vol.11, pp. 4860-4867.

Ramírez-Delgadillo, R., Vargas-Ponce, O., Arreola-Nava, H. J., Cedano-Maldonado, M., González-Tamayo, R., González-Villarreal, L. M., & Rodríguez-Contreras, A. (2010). Catálogo de plantas vasculares de Jalisco. Guadalajara: Universidad de Guadalajara. *Sociedad Botánica de México*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Repositorio de Objetos de la Universidad de Sevilla (RODAS). (2012). Rotavapor. Septiembre, 2019, de Universidad de Sevilla Sitio web: https://rodas5.us.es/file/116d23b8-c458-2012-481b-2357ffa2b34/2/modulo_general_SCORM.zip/pagina_19.htm

Reynoso, M. A., Vera, N., Aristimuño, M. E., Daud, A., & Riera, A. S. (2013). Antinociceptive activity of fruits extracts and “arrobe” of *Geoffroea decorticans* (chañar). *Journal of ethnopharmacology*, 145(1), 355-362.

Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience.

Robinson, R. R. (1983). Isolated proteinuria in asymptomatic patients. In *Nephrology Forum* (pp. 5-26). Springer.

Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gómez-Humarán, I. M., Gaona-Pineda, E. B., Gómez-Acosta, L. M., & Hernández-Ávila, M. (2017). Diseño metodológico de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Pública de México*. Vol. 59, pp. 299-305.

Rose, B. D., & McCulloch, D. K. (2000). Microalbuminuria en la nefropatía diabética. *Revista Cubana de Medicina*. Vol. 39, pp. 57-65.

Saenz, M. T., Fernandez, M. A., & Garcia, M. D. (1997). Antiinflammatory and analgesic properties from leaves of *Eryngium foetidum* L.(Apiaceae). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products*. Vol. 11, pp. 380-383.

Sánchez, L., & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cultura científica*. Vol 3, pp. 40-45.

Sangian, H., Faramarzi, H., Yazdinezhad, A., Mousavi, S. J., Zamani, Z., Noubarani, M., & Ramazani, A. (2013). Antiplasmodial activity of ethanolic extracts of some selected medicinal plants from the northwest of Iran. *Parasitology research*. Vol. 112, pp. 3697-3701.

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Vol. 78). Convenio andres bello.

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205.

Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, L., & Pahua Díaz, D. (2016). Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Revista de la Facultad de Medicina*. Vol. 59, pp. 8-22.

Stevens, L. A., Coresh, J., Greene, T., & Levey, A. S. (2006). Assessing kidney function measured and estimated glomerular filtration rate. *New England Journal of Medicine*. Vol. 354, pp. 2473-2483.

Stevens, L. A., Schmid, C. H., Greene, T., Zhang, Y. L., Beck, G. J., Froissart, M., & Steffes, M. W. (2010). Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m². *American Journal of Kidney Diseases*. Vol. 56, pp. 486-495.

Tabacco, A., Meiattini, F., Moda, E., & Tarli, P. (1979). Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clinical chemistry*. Vol. 25, pp. 336-337.

Tarrés, M. C., Martinez, S. M., Montenegro, S. M., Picena, J. C., Naves, A., Figueroa, N. S., & Rabasa, S. L. (1990). Relación entre dieta, biomasa y expresión de la diabetes en la rata eSS. *Medicina (Buenos Aires)*, 50(3), 235-243.

Tejedor, A., & De las Cuevas Bou, X. (2008). Cuidado paliativo en el paciente con enfermedad renal crónica avanzado (grado 5) no susceptible de tratamiento dialítico. *Nefrología*. Vol. 28, pp. 129-136.

Thiem, B., Goslinska, O., Kikowska, M., & Budzianowski, J. (2010). Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Herba Polonica*. Vol. 56.

Thomas, R., Kanso, A., & Sedor, J. R. (2008). Chronic kidney disease and its complications. *Primary care: Clinics in office practice*. Vol. 35, pp. 329-344.

Torres, L. O., Pérez, M. E. T., & Contreras, A. A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Edicions Universitat Barcelona.

Traynor, J., Mactier, R., Geddes, C. C., & Fox, J. G. (2006). How to measure renal function in clinical practice. *Bmj*. Vol. 333, pp. 733-737.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of clinical Biochemistry*. Vol. 6, pp. 24-27.

Tsai, W. C., Wu, H. Y., Peng, Y. S., Ko, M. J., Wu, M. S., Hung, K. Y., & Chien, K. L. (2016). Risk factors for development and progression of chronic kidney disease: a systematic review and exploratory meta-analysis. *Medicine*. Vol. 95.

Universidad Nacional Autónoma de México. (2014). *Eryngium alternatum*. Junio, 2019, de Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana Sitio web: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>

Vaidya V. S., Ferguson M.A., Bonventre J.V. (2008). Biomarcadores de lesión renal aguda. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Vol. 48, pp. 463–493.

Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., & Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 5(3), 382-387.

Wang, J., Gao, H., Ke, D., Zuo, G., Yang, Y., Yamahara, J., & Li, Y. (2013). Improvement of liquid fructose induced adipose tissue insulin resistance by ginger treatment in rats is associated with suppression of adipose macrophage related proinflammatory cytokines. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.

Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic kidney disease. *The Lancet*. Vol. 389, pp. 1238-1252.

World Health Organization. (2018). Noncommunicable diseases. 7 de Mayo, de World Health Organization Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/non-communicable-diseases>

Yang, M., Liu, C., Jiang, J., Zuo, G., Lin, X., Yamahara, J., & Li, Y. (2014). Ginger extract diminishes chronic fructose consumption-induced kidney injury through suppression of renal overexpression of proinflammatory cytokines in rats. *BMC complementary and alternative medicine*. Vol. 14, pp. 174.

Yockteng F. (2017). Biología de la *Artemia* spp. Octubre, 2019, de Bioartemia, compañía limitada. Sitio web: <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/>

Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. Vol. 414, pp. 782.

10. Anexos

I	Extremadamente tóxico	1-10 µg / ml
II	Altamente tóxico	10-100 µg / ml
III	Moderadamente tóxico	100-500 µg / ml
IV	Ligeramente tóxico	500-1000 µg / ml
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500 µg / ml
VI	Relativamente inocuo	>1500 µg / ml

Tabla 1. Clasificación de la toxicidad según CYTED

Volumen de extracto o ácido ascórbico (µl)	Volumen de etanol (µl)	Volumen de la solución DPPH (µl)	Volumen total (µl)
700	300	500	1500
500	500	500	1500
250	750	500	1500
100	900	500	1500
50	950	500	1500
25	975	500	1500

Tabla 2. Sistema de soluciones empleado para el ensayo de toxicidad con el modelo de *Artemia* spp.

Solución (μg / ml)	Agregar de la solución de 100,000 μg / ml	Agua marina arti- ficial (μl)	Volúmen final (μl)
100,000			
1,000	50	4,950	5,000
500	25	4,975	5,000
250	12.5	4,987.5	5,000
100	5	4,999.5	5,000
50	2.5	4,997.5	5,000
30	1.5	4,998.5	5,000
10	0.5	4,999.5	5,000

Tabla 3. Sistema de soluciones empleado para la evaluación de la capacidad antioxidante del extracto de *E. alternatum* y del control positivo (ácido ascórbico).