

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE ORÉGANO
MEXICANO (*Lippia graveolens*) EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JUAN MANUEL MOLINERO MORENO

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens*) EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JUAN MANUEL MOLINERO MORENO

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODALES

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ.
DIRECTORA

Dra. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ
SINODAL

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
SINODAL

M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Primero a mis guías espirituales Dios y la Virgen de Guadalupe, a los cuales dedico todos mis esfuerzos día a día.

A mis padres Lorenzo y Juana por haberme apoyado durante todo este camino, ya que sin ellos no estaría donde estoy ahora. Este logro también es de ustedes, los quiero y los admiro.

A mis hermanos Hugo, Adriana y Brenda, por haberme soportado cuando llegaba cansado y estresado; gracias por aguantarme.

A mi mamá Concha y mi tío Rubén por haberme dado su apoyo incondicional durante toda mi vida; ese apoyo me ayudo a concluir mi carrera, muchas gracias.

A mi tío Emiliano por encontrar en él palabras que me ayudaron a encontrar las respuestas más simples en mis problemas.

A mi Facultad de Química a la cual le debo todo lo que soy, siempre defenderé su honor y su prestigio con mi esfuerzo y dedicación día a día.

A mis maestros, ya que sin su valioso conocimiento y dedicación no habría concluido mi carrera; me llevo lo mejor de cada uno de ellos.

A la Dra. Minerva por haberme aceptado y ayudado durante todo este trabajo de investigación, dedicando tiempo y conocimiento; le estaré eternamente agradecido.

A mis sinodales Dra. Sandra, Dra. Rosalía y M. en C. Isidro por haber tomado un poco de su valioso tiempo para revisar y aportar a este trabajo de investigación.

A mis compañeros de postgrado por haberme ayudado cuando los necesite, no menciono nombres ya que nunca terminaría, pero muchas gracias.

A mis compañeros y amigos por haberme alentado y apoyado durante toda la carrera y en esta tesis.

Nuestro miedo más profundo no es que seamos inadecuados.
Nuestro miedo más profundo es que somos poderosos sin límite.
Es nuestra luz, no la oscuridad lo que más nos asusta.
Nos preguntamos: ¿quién soy yo para ser brillante, precioso, talentoso y fabuloso?
En realidad, ¿quién eres tú para no serlo?
Eres hijo del universo.
El hecho de jugar a ser pequeño no sirve al mundo.
No hay nada iluminador en encogerte para que otras personas cerca de ti no se sientan inseguras.
Nacemos para hacer manifiesto la gloria del universo que está dentro de nosotros.
No solamente algunos de nosotros: Está dentro de todos y cada uno.
Y mientras dejamos lucir nuestra propia luz, inconscientemente damos permiso a otras personas para hacer lo mismo.
Y al liberarnos de nuestro miedo, nuestra presencia automáticamente libera a los demás.

Discurso de Nelson Mandela
como Presidente Electo de Sudáfrica
(1994)

V.1.2.1	Extractos	23
V.1.2.2	Animales	24
V.2	Métodos	25
V.2.1	Preparación de los extractos de orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>)	25
V.2.2	Administración de los extractos a los grupos experimentales	25
V.2.3	Sacrificio y obtención de muestras	25
V.2.4	Preparación de citosoles para la determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión-S-transferasa (GST)	26
V.2.5	Determinación de la concentración de glutatión reducido(GSH) por medio de ácido 5,5'-ditiol-2-dinitrobenzoico (DTNB)	26
V.2.5.1	Procedimiento para realizar la curva estándar de GSH	27
V.2.5.2	Procedimiento para precipitar las proteínas de los citosoles muestra	27
V.2.5.3	Procedimiento para la determinación espectrofotométrica	28
V.2.6	Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST): CDNB	28
V.2.6.1	Procedimiento para el ensayo enzimático de GST	29
V.2.7	Preparación de citosoles para la determinación de glutatión peroxidasa (GPx)	30
V.2.7.1	Determinación de glutatión peroxidasa (GPx)	30
V.2.8	Evaluación de la concentración de glucosa y perfil lipídico en suero	31
V.2.8.1	Glucosa	31
V.2.8.2	Colesterol	32
V.2.8.3	Colesterol HDL	32

V.2.8.4	Triglicéridos	33
V.2.9	Cuantificación de proteína total por método del ácido bicinconínico (BCA)	34
V.2.10	Análisis estadístico	34
VI.	RESULTADOS	36
VI.1	Concentración de glutatión reducido (GSH) en ratas Sprague-Dawley tratadas con el extracto acuoso, butanolico, metanólico y total de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	36
VI.1.1	Concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado inducido con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	36
VI.1.2	Concentración de glutatión reducido (GSH) en riñón inducido con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	37
VI.2	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en ratas Sprague-Dawley tratadas con el extracto acuoso, butanolico, metanólico y total de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	42
VI.2.1	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	42
VI.2.2	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	44
VI.2.3	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en pulmón por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	44
VI.2.4	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en intestino delgado por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	46

VI.2.5	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en intestino grueso por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	48
VI.3	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en ratas Sprague-Dawley tratadas con el extracto acuoso, butanólico, metanólico y total de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	54
VI.3.1	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en hígado por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	54
VI.3.2	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en riñón por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	54
VI.3.3	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en pulmón por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	57
VI.3.4	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en intestino delgado por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	57
VI.3.5	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en colón distal y proximal por efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	60
VI.4	Efectos biológicos de la administración intragastrica de los diferentes extractos de orégano mexicano sobre los niveles de glucosa y perfil de lípidos en el suero de ratas Sprague-Dawley	60
VI.4.1	Colesterol	64
VI.4.2	Colesterol HDL	65
VI.4.3	Triglicéridos	68
VI.4.4	Glucosa	68

VII.	DISCUSIÓN	73
VIII.	CONCLUSIONES	85
IX.	BIBLIOGRAFÍA	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Número de animales por dosis y extracto	24
2	Orden de adición de reactivos para realizar la curva estándar de GSH	27
3	Orden de adición de reactivos para la determinación de GSH	28
4	Orden de adición de reactivos para el ensayo enzimático para GST	29
5	Concentración de GSH en los diferentes órganos de rata Sprague-Dawley tratadas con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	41
6	Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en ratas Sprague-Dawley tratadas con extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	53
7	Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) ratas Sprague-Dawley tratadas con extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	63
8	Análisis de perfil lipídico y glucosa en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	72
9	Porcentaje de inducción o inhibición enzimática (GST y GPx) y no-enzimática (GSH) por órgano, extracto y dosis en ratas Sprague-Dawley	77
10	Porcentaje de incremento y disminución en los niveles de glucosa y perfil lipídico por extracto y dosis	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Amplio alcance de los antioxidantes	7
2	Estructuras químicas de algunos polifenoles de la dieta	13
3	Aumento en el número de publicaciones en relación con los diversos antioxidantes en los últimos 30 años.	14
4	Orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>)	17
5	Distribución geográfica aproximada de <i>Lippia graveolens</i>	18
6	Principales compuestos del orégano mexicano (<i>Lippia graveolens</i>)	19
7	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en los niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado después de dos semanas de tratamiento	38
8	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en los niveles de glutatión reducido (GSH) en riñón después de dos semanas de tratamiento	40
9	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado después de dos semanas de tratamiento	43
10	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón después de dos semanas de tratamiento	45
11	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en pulmón después de dos semanas de tratamiento	47

12	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en intestino delgado después de dos semanas de tratamiento	49
13	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colón distal después de dos semanas de tratamiento	51
14	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colón proximal después de dos semanas de tratamiento	52
15	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en hígado después de dos semanas de tratamiento	55
16	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en riñón después de dos semanas de tratamiento	56
17	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en pulmón después de dos semanas de tratamiento	58
18	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en intestino delgado después de dos semanas de tratamiento	59

19	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en colón distal después de dos semanas de tratamiento	61
20	Efecto de los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en colón proximal después de dos semanas de tratamiento	62
21	Niveles de colesterol en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	66
22	Niveles de colesterol HDL en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	67
23	Niveles de triglicéridos en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	69
24	Niveles de glucosa en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i>	71
25	Cooperatividad entre los sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos	74

I. INTRODUCCIÓN

La creciente aceptación de la dieta como terapia preventiva y de la medicina verde como alternativa está acompañada de muchas ideas erróneas, una de las más frecuentes es atribuirles a las vitaminas todos los beneficios de los vegetales y el desconocimiento (y en consecuencia la falta de estímulo para su estudio) de otros agentes presentes en ellas que contribuyen también con un amplio espectro de propiedades a la prevención de ciertas enfermedades. Un ejemplo de éstos son los polifenoles.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en una gran diversidad de plantas, algunas de uso común como el orégano y, por sus propiedades antioxidantes, merecen mayor atención.

La hoja del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se usa no sólo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; motivos que lo han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales del orégano o sus compuestos activos, por ejemplo los terpenoides, para sus cuidados primarios de salud. Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, a partir de los extractos acuosos y sus aceites esenciales, en los cuales se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus

derivados 6'-O-*p*-coumaroil y 6'-O-cafeoil. También se han identificado flavonoides como la naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina.

Los adelantos científicos y, específicamente en la medicina, son realmente sorprendentes tanto en el conocimiento de las enfermedades y su tratamiento como de sus complicaciones, no obstante quedan aún muchas dudas que aclarar con respecto al origen de éstas. En los últimos años viene desarrollándose cada día un interés mayor por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno, todo esto dado por la importancia que poseen en la bioquímica, la biología y la medicina.

Los radicales libres están implicados en la causa de enfermedades crónico degenerativas por ocasionar daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Es por esto que los antioxidantes, ya sean de origen sintético o natural, desempeñan una función fundamental en la prevención de estas enfermedades, debido a su capacidad para neutralizar la acción de los radicales libres.

Aunque a menudo los efectos nocivos de los antioxidantes sintéticos sobre animales de experimentación no son extrapolables a la especie humana por las diferencias fisiológicas y anatómicas, los consumidores perciben que las sustancias naturales son más inocuas que las sintéticas y, por ello, las prefieren. Ante esto, y sabiendo que las sustancias naturales se utilizan desde la antigüedad, varios centros de investigación, entre ellos el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, se han enfocado en la búsqueda de nuevas sustancias con propiedades antioxidantes a partir de diversas fuentes naturales, como el orégano, que puedan reemplazar a los antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados; claro está, después de un estudio exhaustivo de sus propiedades biológicas.

II. Antecedentes

II.1 Estrés oxidativo y nitrosativo

"Vivir con el riesgo de estrés oxidativo es un precio que deben pagar los organismos aeróbicos". El estrés oxidativo ha tomado recientemente un mayor interés, fundamentalmente a causa de su papel aceptado como un importante contribuyente a la senescencia y en el desarrollo de diversas patologías, que tienen graves implicaciones para la salud pública. El término se utiliza para definir un conjunto de fenómenos interrelacionados que incluyen una elevada generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el daño oxidativo a las células constituyentes. Los factores desencadenantes de estrés oxidativo pueden ser variados, desde hereditaria o defectos genéticos adquiridos (mutaciones), factores medioambientales (radiación o toxinas) o simplemente eventos estocásticos, tales como las fluctuaciones metabólicas. La generación intracelular de ERO de por sí es un proceso inevitable (y, a veces, fisiológicamente importante). Para contrarrestarlo, las mitocondrias, las células y, en general los organismos, poseen numerosos sistemas de defensa contra las ERO. Debe aclararse que la verdadera fuente de estrés oxidativo no es la generación de ERO en sí, sino el espacio-temporal de desequilibrio a favor de ellas (Andreyev y col., 2005).

II.1.1 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

La formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), representa una causa importante de daño oxidativo en diversas enfermedades relacionadas con la formación de radicales libres. En presencia de trazas de metales de transición (con más frecuencia Fe), O_2^- y H_2O_2 altamente reactivos generan radicales hidroxilo, que son responsables de la oxidación biológica (Albano, 2005).

En general, las ERO se dividen en radicales libres de oxígeno y las que no son radicales. Los radicales libres contienen uno o más electrones desapareados y éstos incluyen superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-), óxido nítrico (NO^-), alcoxilo (RO^-) o el radical peroxilo (ROO^-). Las especies reactivas que no son radicales incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$) e hipoclorito ($HOCl$) (Storz, 2005).

Si el balance entre la formación y la eliminación de las ERO se altera a favor de lo primero, estas especies oxidantes inducen reacciones en cadena, capaces de dañar moléculas de importancia biológica (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). En particular, el ataque a los lípidos provoca su oxidación y esto a su vez conduce a la formación de nuevas especies de radicales libres y metabolitos tóxicos, por lo que se desencadena una cascada de eventos que amplifican el daño (Novo y Parola, 2008). Las ERO pueden generarse por fuentes como los contaminantes, el tabaquismo, factores ambientales o como un producto secundario de las reacciones del metabolismo. Por lo tanto, el estrés oxidativo está asociado al declive general de las funciones celulares, tisulares y orgánicas, y está relacionado con enfermedades como la diabetes, las enfermedades del corazón, enfermedad mitocondrial, Alzheimer, aterosclerosis lateral amiotrófica, Parkinson, degeneración muscular, artritis reumatoide, cáncer, síndrome metabólico, entre otras. Además, una inadecuada protección contra las EROs es el factor principal que da origen al envejecimiento e incrementa la vulnerabilidad a enfermedades crónico-degenerativas (Salvadó, 2005). Sin embargo, otro aspecto que ha surgido es cómo las ERO afectan diferentes respuestas celulares.

II.1.2 Especies reactivas de nitrógeno (ERN)

Del mismo modo, los radicales libres derivados del nitrógeno son conocidos como ERNs y sus principales precursores son el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Papas, 1998; Ortega y col., 2010).

Bajos niveles de ERNS se producen continuamente en las células de mamíferos y desempeñan funciones fisiológicas importantes. Estas incluyen procesos tan diversos como la expresión de genes, la proliferación y supervivencia celular, la remoción de patógenos por el sistema inmune, y la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando la cantidad de ERNs excede la capacidad antioxidante de la maquinaria, el resultado es un estrés nitrosativo que puede inducir daños irreversibles en todas las macromoléculas celulares, incluyendo el ADN. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis redox es crítico para la función celular y la supervivencia, y su alteración está implicada en la fisiopatología de muchas enfermedades humanas, tales como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la artritis reumatoide, los trastornos neurológicos (por ejemplo, el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson), o el cáncer (Ortega y col., 2010).

Debido a que la oxidación es un proceso natural, el organismo requiere mecanismos preventivos para retardar el proceso de oxidación. Las vitaminas A, C, E y los oligoelementos (zinc, manganeso, cobre, selenio y el hierro) son ejemplos de antioxidantes que se encuentran en las frutas y verduras, y son requeridos por las enzimas detoxificantes y antioxidantes endógenos no enzimáticos (Albano, 2005).

II.2 Antioxidantes

Es de gran interés para el público en general, médicos y expertos en nutrición, conocer la capacidad antioxidante de los componentes en los alimentos que consumimos que benefician nuestra salud. Debido a la complejidad de la composición de los alimentos, la separación de cada compuesto antioxidante y su estudio en forma individual resulta costoso e ineficaz; además, deben considerarse

las posibles interacciones sinérgicas entre los compuestos antioxidantes en una mezcla de alimentos.

La palabra "antioxidante" es cada vez más popular en la sociedad moderna. La definición de diccionario de antioxidantes es más bien sencilla, pero con una anotación tradicional: "es una sustancia que se opone a la oxidación o inhibe reacciones promovidas por el oxígeno o peróxidos". La definición biológica de los antioxidantes es "sustancias naturales o sintéticas añadidas a los productos para prevenir o retrasar el deterioro por la acción del oxígeno". En la bioquímica y la medicina, los compuestos con características antioxidantes "son sustancias orgánicas o de otro tipo, tales como la vitamina E o el β -caroteno, que son capaces de contrarrestar la efectos nocivos de la oxidación en los tejidos animales".

En la ciencia de los alimentos, los antioxidantes tienen un alcance más amplio, en el sentido de que incluyen componentes que evitan que las grasas en los alimentos se oxiden, así como en la dieta. Los antioxidantes son "una sustancia en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de las ERO y ERN, sobre la función fisiológica normal en los seres humanos". Por lo tanto, una dieta rica en antioxidantes puede atrapar las ERO y ERN para detener las reacciones en cadena de los radicales, o puede inhibir la reacción de los oxidantes que se estaban formando en primer lugar. Los antioxidantes de la dieta son a menudo inhibidores de la reacción de radicales en cadena, de metales quelantes, inhibidores de enzimas oxidativas, etc. En la Figura 1 se describe el alcance de los antioxidantes en tres campos (biológico, dieta, químico); así como el tipo de antioxidante (no enzimático y enzimático). A pesar de la diferencia en el ámbito de aplicación, un inhibidor de la reacción en cadena de radicales libres es comúnmente considerado como un antioxidante (Huang y col., 2005).

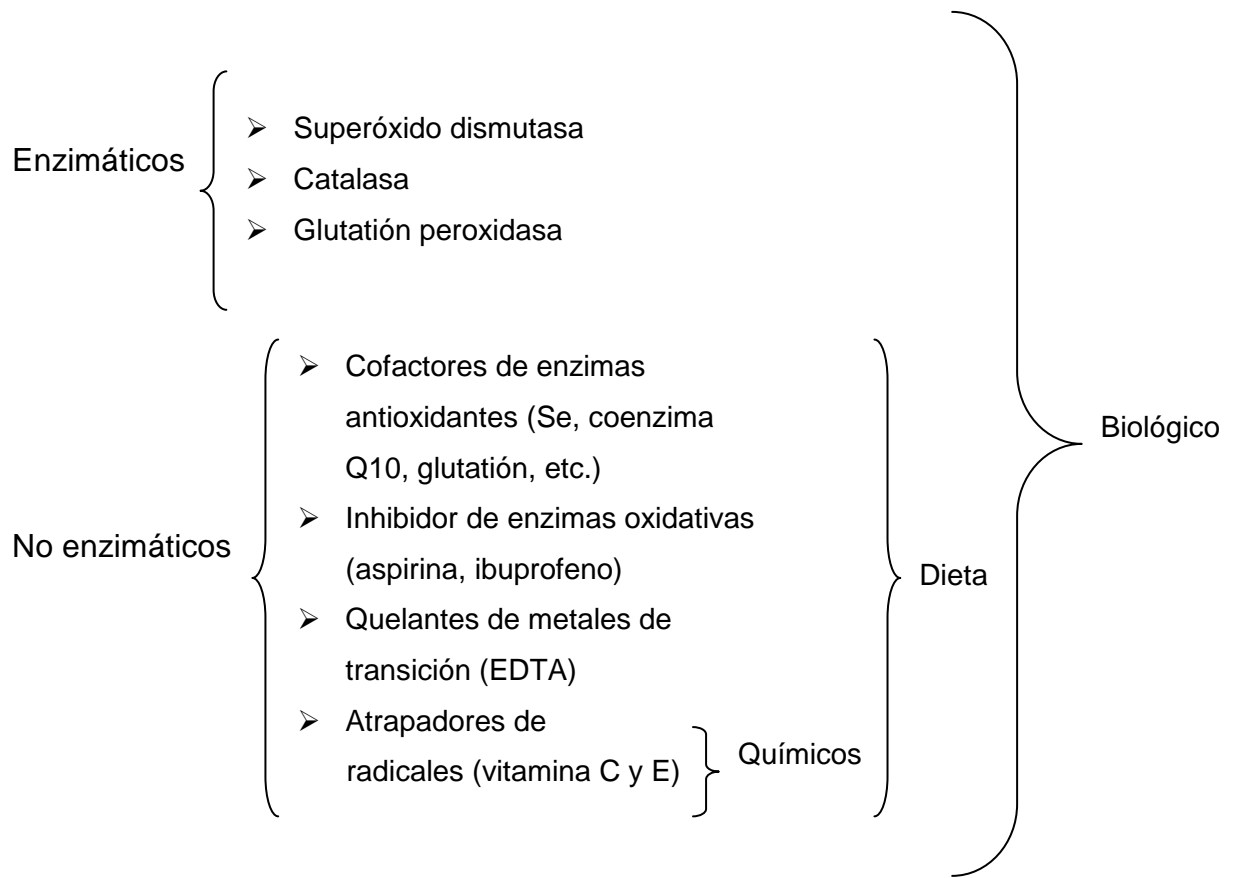


Figura 1. Amplio alcance de los antioxidantes (adaptada de Huang y col., 2005).

En los últimos años, se ha acelerado y modificado drásticamente el hábito y estilo de vida de las personas; el estrés cotidiano que se vive, la dieta, el medio ambiente, los lugares de trabajo, fármacos y xenobióticos en general son una fuente de ERO debido a los procesos de biotransformación que sufren en el organismo. Es por ello, que el aporte y consumo diario de antioxidantes a través de la dieta ha tomado gran importancia.

II.2.1 Sistemas celulares de defensa antioxidante

Una gran diversidad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se han desarrollado en los organismos aeróbicos para contrarrestar los efectos de las ERO

y ERN sobre las biomoléculas críticas como el DNA, el RNA y las proteínas (Figura 1). Estudios *in vitro*, *in vivo* y epidemiológicos han demostrado que varios antioxidantes son capaces de disminuir en un amplio espectro enfermedades relacionadas con la edad (Baglioni y col., 2006). Así mismo, se ha informado que el estrés oxidativo aumenta en sujetos ancianos, posiblemente derivados de una producción descontrolada de radicales libres, el envejecimiento de las mitocondrias y la disminución de defensas antioxidantes (Hagen y col., 2005).

II.2.1.1 Complejos enzimáticos involucrados en la biotransformación y eliminación de xenobióticos

En los organismos, las enzimas biotransformadoras de xenobióticos desempeñan papeles centrales en el metabolismo, eliminación y/o desintoxicación de compuestos xenobióticos o exógenos introducidos en el cuerpo. En general, las enzimas biotransformadoras de xenobióticos protegen el cuerpo contra exposiciones potenciales a xenobióticos perjudiciales del medio ambiente, así como determinados endobióticos (Crabb y col., 2005). Con el fin de minimizar las posibles lesiones causadas por estos compuestos, la mayoría de los tejidos y órganos están bien equipados con diversos y diferentes sistemas enzimáticos incluyendo la fase I, fase II, así como la fase III (transportadores), que están presentes en abundancia, ya sea en niveles basales y/o inducibles después de la exposición a xenobióticos (Ah-Ng y col., 2005).

Reacciones o enzimas de Fase I. Este grupo de enzimas o reacciones representan el primer camino seguido para la metabolización de la mayoría de los xenobióticos. En esencia, se trata de reacciones oxidativas, reductoras o hidrolíticas, que tienen por objeto la adición o exposición de algún grupo polar o funcional en la estructura química primaria (Bello y López, 2001). Estas enzimas incluyen principalmente a la familia del citocromo P450 (CYP), enzimas microsomales que se encuentran en abundancia en el hígado, tracto gastrointestinal, pulmón y riñón. Este conjunto

enzimático consiste en familias y subfamilias de enzimas que se clasifican sobre la base de su secuencia de aminoácidos o idénticas similitudes. Más de treinta y seis familias de genes se han descrito hasta la fecha; doce familias existen en todos los mamíferos, que comprenden veintidós subfamilias. En humanos, cinco familias de genes CYP, como CYP1, CYP2, CYP3, CYP4 y CYP7, se cree que desempeñan funciones cruciales en la insuficiencia hepática, así como en el metabolismo no hepático y en la eliminación de xenobióticos y drogas.

Reacciones o enzimas de fase II o de conjugación. Este conjunto consta de diversas familias de enzimas, incluidas las sulfotransferasas (SULT), UDP-glucuronosiltransferasas (UGT), DT-diaforasa o NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (NQO1) o NAD(P)H:menadiona reductasa (NMO), epóxido hidrolasas (EH), glutatión S-transferasas (GST) y N-acetiltransferasas (NAT). Cada superfamilia de las enzimas de fase II se compone de familias y subfamilias de genes que codifican las distintas isoformas con diferente especificidad de sustrato, tejido y de expresión, así como de inducción e inhibición por xenobióticos. En general, la conjugación con la fase II aumenta la hidrofiliidad de los xenobióticos y con ello mejora la excreción en la bilis y/o la orina y, en consecuencia, un efecto de desintoxicación. Las reacciones de fase II suelen ser reacciones de conjugación orientadas a incrementar la hidrosolubilidad de aquellas moléculas que ya disponen de grupos polares, como los introducidos o expuestos por las reacciones de fase I con el fin de proporcionarles una mayor facilidad para su excreción. Aunque en determinadas situaciones, la conjugación con las enzimas de fase II puede resultar en la activación y en un aumento en la toxicidad de metabolitos.

Las glutatión S-transferasas (GST) son una familia de isoenzimas citoplásmicas que desempeñan un papel importante en la desintoxicación de una gran diversidad de metabolitos activos y de compuestos electrofílicos exógenos o endógenos, a través de la conjugación con GSH. De esta forma, la enzima neutraliza los sitios activos del electrófilo y genera productos menos reactivos o más hidrosolubles y,

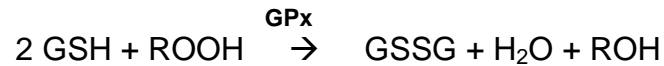
por tanto, más fácilmente excretables (García, 2004; Zhang y col., 2007). Así mismo, la glutatión-S-transferasa (GST) desempeña un papel importante en el metabolismo y excreción de compuestos potencialmente genotóxicos previniendo lesiones del ADN y la formación de aductos (Lecomte y col., 2006).

Fase III o transportadores. Estos conjuntos de proteínas incluyen las P-glicoproteínas (P-gp), las proteínas relacionadas con resistencia a múltiples drogas (MDR-proteínas) y el polipéptido transportador de aniones orgánicos 2 (OATP2) que se expresa en diversos tejidos como el hígado, los intestinos, los riñones y el cerebro, donde forman una formidable barrera contra la penetración de drogas y desempeñan funciones cruciales en la absorción, distribución y excreción (Xu y col., 2005).

II.2.1.2 Enzimas antioxidantes

Varias enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), trabajan en cooperación con otras moléculas no enzimáticas como el glutatión reducido (GSH) para limitar los niveles de ERO y prevenir el daño oxidativo. SOD cataliza la reducción del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, que luego es descontaminado por la CAT y GPx, tanto a nivel intra como extracelulares. Oligoelementos, como el cobre (Cu), selenio (Se), manganeso (Mn) y zinc (Zn), son componentes esenciales de las defensas antioxidantes como parte de la estructura de estas enzimas antioxidantes presentes en el citosol, mitocondrias o plasma. Se han identificado tres isoformas de SOD: dos, con Cu y Zn en su sitio catalítico, que se localizan tanto en el citoplasma (CuZn-SOD, SOD1) o extracelular (EC-SOD, SOD3); una tercera isoforma se localiza en las mitocondrias con Mn como cofactor (Mn-SOD, SOD2). Por otro lado, los metales de transición Cu y Fe son componentes esenciales de la CAT, mientras que el Se es un constituyente de la GPx (Papas, 1998; Devasagayam y col., 2004).

La GPx se distribuye ampliamente en el citosol, en la mitocondria y el núcleo. La GPx reduce tanto a los peróxidos, como a los hidroperóxidos lipídicos, a agua y alcohol lipídico (Baynes y Dominiczak, 2004). Normalmente, los peróxidos son eliminados por la GPx que utiliza el GSH como agente reductor, oxidándose éste a su vez (GSSG), como se muestra en la siguiente reacción:



Por lo tanto, es importante mantener los niveles adecuados de los sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Existe evidencia de que una dieta alta en frutas y vegetales, rica en compuestos antioxidantes, es fundamental en la protección contra enfermedades crónicas degenerativas, lo que sugiere un efecto quimioprotector de los vegetales a través de la inducción de enzimas de fase II o antioxidantes en diferentes tejidos (Dinkova-Kostova y col., 2005; Munday y col., 2005).

II.2.1.3 Antioxidantes no-enzimáticos

En cuanto al sistema de defensa no enzimático, diversas proteínas antioxidantes generalmente pueden tener funciones duales, es decir, como proteínas transportadoras y también como quelantes en cuestión de iones metálicos. Sin embargo, el glutatión reducido (GSH) es el antioxidante no enzimático más relevante, su función no es eliminar directamente las ERO, sino mantener el equilibrio redox y participar en las reacciones enzimáticas antioxidantes proporcionando los reductores equivalentes.

El GSH actúa a través de tres reacciones: 1) reacciones de conjugación, 2) oxidación, y 3) degradación, participando como cofactor de las enzimas GPx y GST, por lo que es responsable de la protección de los compuestos o grupos tioles celulares de la oxidación. El GSH, por su relación con el ácido ascórbico y como

reservorio operativo del NO en forma de S-Nitrosoglutatión, juega un importante rol en los mecanismos antioxidantes involucrados en la regulación de eventos celulares que incluyen expresión genética, síntesis de proteínas y ADN, proliferación celular y apoptosis, sistemas de traducción de señales y producción de citocinas (Gaeda y col., 2005).

El GSH también desempeña múltiples funciones clave en el desarrollo normal del sistema inmunitario. En primer lugar, la inflamación está estrechamente vinculada a la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) y GSH + GSSG. En segundo lugar, los niveles intracelulares normales de GSH son esenciales para las funciones celulares del sistema inmune tales como quimiotaxis, fagocitosis, inducción de apoptosis, integridad microtubular, señalización celular, presentación de antígenos, liberación de enzimas lisosomales, acción bactericida y otras actividades. En tercer lugar, el GSH afecta profundamente al sistema de NO, ya que la deficiencia de GSH induce una reducción de NO disponible para su uso en bactericidas y funciones de señalización celular (Bishop y col., 2005).

Debido a que la oxidación es un proceso natural, el organismo requiere mecanismos preventivos para retardar el proceso de oxidación. Las vitaminas A, C, E y los oligoelementos (zinc, manganeso, cobre, selenio y el hierro) son ejemplos de antioxidantes (no-enzimáticos) que se encuentran en las frutas y verduras, y son requeridos por las enzimas detoxificantes y antioxidantes endógeno no enzimáticos (Johnson y col., 2005).

De forma similar, los flavonoides (incluyendo flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas y catequinas) son fuertes antioxidantes y contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total (Scalbert y col., 2005).

II.3 Polifenoles en los alimentos y sus efectos biológicos

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Su ingesta alimentaria total podría ser tan alta como 1 g/día, mayor que el de todas las demás clases de fitoquímicos y antioxidantes dietéticos conocidos (10 veces mayor que la vitamina C y 100 veces mayor que la vitamina E y los carotenoides). Las principales fuentes de alimentación de los polifenoles son las frutas y bebidas procedentes de plantas tales como los zumos de frutas, té, café y vino tinto. Las hortalizas, los cereales, el chocolate y las legumbres también contribuyen a la ingesta total de polifenoles. Varios cientos de diferentes polifenoles se han identificado en los alimentos y los dos principales tipos de polifenoles son los flavonoides y ácidos fenólicos (Figura 2) (Johnson y col., 2005).

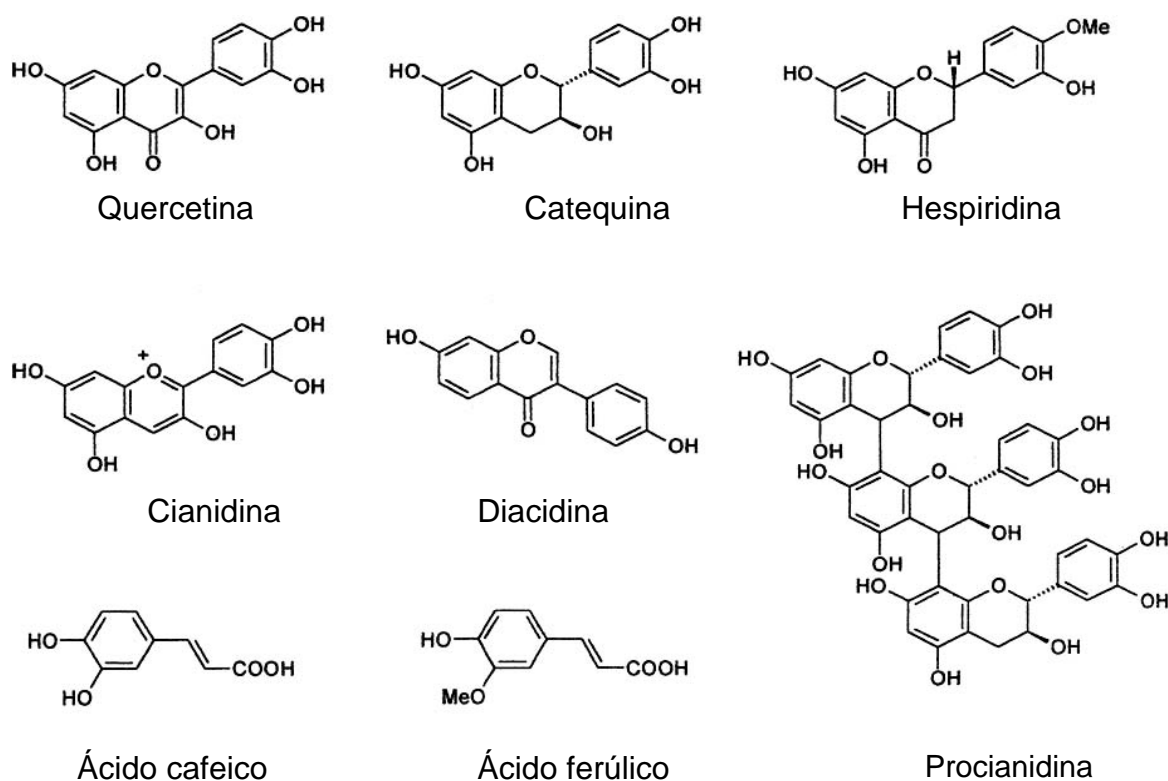


Figura 2. Estructuras químicas de algunos polifenoles de la dieta (adaptado de (Johnson y col., 2005).

A pesar de su amplia distribución en las plantas, los efectos de polifenoles de la dieta en la salud han llamado la atención de los nutriólogos recientemente. Hasta mediados de la década de los 90, los antioxidantes más ampliamente estudiados eran las vitaminas, los carotenoides y los minerales. La investigación sobre flavonoides y otros polifenoles, así como sus propiedades antioxidantes y sus efectos en la prevención de enfermedades, realmente comenzó después de 1995 (Figura 3), por lo que los flavonoides fueron apenas mencionados en los libros de texto publicados antes de esa fecha. El principal factor que ha retrasado la investigación sobre los polifenoles es la gran diversidad y complejidad de sus estructuras químicas.

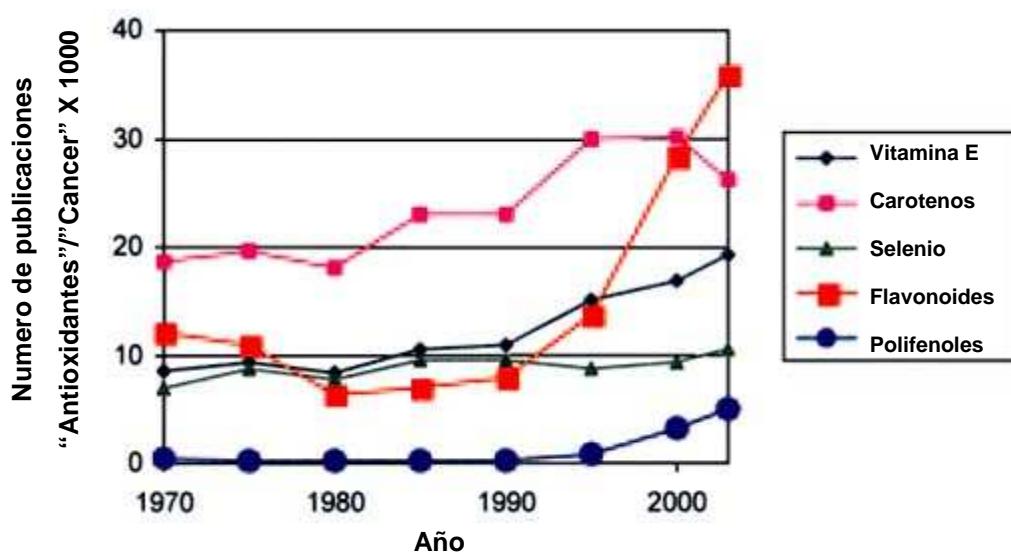


Figura 3. Aumento en el número de publicaciones en relación con los diversos antioxidantes en los últimos 30 años. Las publicaciones se registraron en la base de datos Medline. Los valores se determinaron de la siguiente manera: número de resultados de la consulta “compuesto X” y “año n/número de resultados de la consulta de cáncer” y “año n x 1000”. La palabra clave “cáncer” se ha utilizado como referencia, para tener en cuenta el aumento general del número de publicaciones (adaptado de Manach y col., 2005).

II.3.1 Efecto antioxidante de los polifenoles

Las enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis y las cataratas, entre otras, se asocian con el envejecimiento. Debido a que el daño oxidativo a los componentes de la célula, el ADN, las proteínas y los lípidos se acumulan con la edad, y contribuye a la degeneración de las células somáticas y la patogenicidad de estas enfermedades (Scalbert y col., 2005). Los antioxidantes presentes en los alimentos pueden ayudar a limitar estos daños actuando directamente sobre las ERO o mediante la estimulación de sistemas de defensas endógenos. Por ejemplo, estudios *in vitro* han evaluado la potencia antioxidante de los polifenoles mediante su capacidad para atrapar los radicales libres y su potencia se compara con la de una sustancia de referencia, generalmente Trolox (derivado de la vitamina E soluble en agua), el ácido gálico o la catequina (compuestos fenólicos) (Huang y col., 2005).

Efectivamente, durante muchos años se pensó que los polifenoles y otros antioxidantes eran constituyentes para proteger a las células contra el daño oxidativo a través del barrido de los radicales libres. Sin embargo, este concepto parece ser un exceso de vista de su modo de acción. Más probable, las células responden a los polifenoles, principalmente a través de interacciones con los receptores o enzimas que intervienen en la transducción de señales, que pueden dar lugar a la modificación del estado redox de la célula y pueden desencadenar una serie de reacciones redox-dependiente. A este respecto, se han descrito ambos efectos de los polifenoles como antioxidantes y pro-oxidantes sobre los procesos fisiológicos de las células. Como antioxidantes, los polifenoles pueden mejorar la supervivencia celular; como pro-oxidantes, puede inducir la apoptosis y prevenir el crecimiento de tumores. Sin embargo, los efectos biológicos de los polifenoles pueden extenderse mucho más allá de la modulación del estrés oxidativo (Manach y col., 2005).

II.3.2 Otros efectos biológicos de los polifenoles

La creciente evidencia indica que diversos polifenoles en la dieta pueden influir en el metabolismo de hidratos de carbono en varios niveles. En modelos animales y en un número limitado de estudios en seres humanos realizados hasta la fecha, se ha observado que los polifenoles y los alimentos o bebidas ricos en polifenoles atenúan las respuestas glucémicas postprandiales e hiperglucemia en ayunas, así como la secreción aguda de insulina y la sensibilidad a la insulina. Los posibles mecanismos incluyen la inhibición de la digestión de carbohidratos y la absorción de glucosa en el intestino, la estimulación de la secreción de insulina de las células beta pancreáticas, la modulación de la liberación de glucosa desde el hígado, la activación de los receptores de insulina y la absorción de la glucosa en los tejidos sensibles a la insulina, la modulación de vías de señalización intracelular y la expresión génica (Hanhineva y col., 2010).

Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos sugieren que una alta ingesta de flavonoides provenientes de frutas y vegetales se relaciona con la disminución de diversos factores de riesgo a enfermedades cardiovasculares, a través de la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminución de la presión sanguínea y control de la dislipidemia (Mulvihill y Huff, 2010).

A pesar del número limitado de estudios en humanos, se ha observado que tanto *in vitro* como en modelos celulares los efectos antiinflamatorios de los flavonoides incluyen la inhibición de la síntesis y actividad de mediadores pro-inflamatorios como las citocinas, moléculas de adhesión y proteína C reactiva. A nivel molecular, los flavonoides pueden inhibir la activación de factores de transcripción como NF-kappaB, proteína activadora 1 (AP-1), factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) conocido como Nrf2, entre otros (Serafini y col., 2010).

En México se consumen diversas plantas y hierbas nativas a las cuales se les adjudican propiedades curativas y se utilizan de igual manera en la comida típica de cada región. En dichas plantas y hierbas, entre ellas en el orégano mexicano (*Lippia graveolens*), se han encontrado cantidades importantes de polifenoles, (Johnson y col., 2005), entre otros compuestos, que pueden contribuir con la actividad antioxidante y antiinflamatoria de dichas plantas (García y col., 2002).

II.4 Orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

México es uno de los países con mayor producción y exportación de orégano (*Lippia graveolens*) en el mundo (Figura 4), con 35-40% del mercado internacional, superado sólo por Turquía. Debido a la composición química de sus aceites esenciales, el orégano mexicano se considera como el de más alta calidad comparado con otras especies de orégano, lo que le ha permitido un mayor despegue a su comercialización en los últimos años. Su recolección es complementaria a la agricultura de temporal o seca en zonas áridas y semiáridas de México (González y col., 2007).



Figura 4. Orégano mexicano (*Lippia graveolens*).

Perteneciente a la categoría de productos no maderables, el orégano es una planta caducifolia aromática nativa de Texas y Nicaragua pero su hábitat se extiende

desde el sur de México a Panamá, y de Guatemala a Colombia (Rastrelli y col.,1998). Se le conoce con varios nombres como orégano del cerro, orégano cimarrón, orégano silvestre, orégano mexicano y mejorana, entre otros. Recientemente, esta planta ha adquirido importancia económica debido a que el 90% de la producción de su materia seca útil se exporta a Estados Unidos de Norteamérica y, en menor grado, a Italia y a Japón. El costo promedio de la hoja seca de orégano por kilo es de 8.00 a 9.00 pesos. Durante la cosecha 2002, productores del semidesierto de Querétaro lo vendieron hasta en 11.00 pesos, el precio históricamente más alto pagado a colectores de orégano en México. En la Figura 5 se muestra la principal distribución de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en México (CONAFOR, 2001).

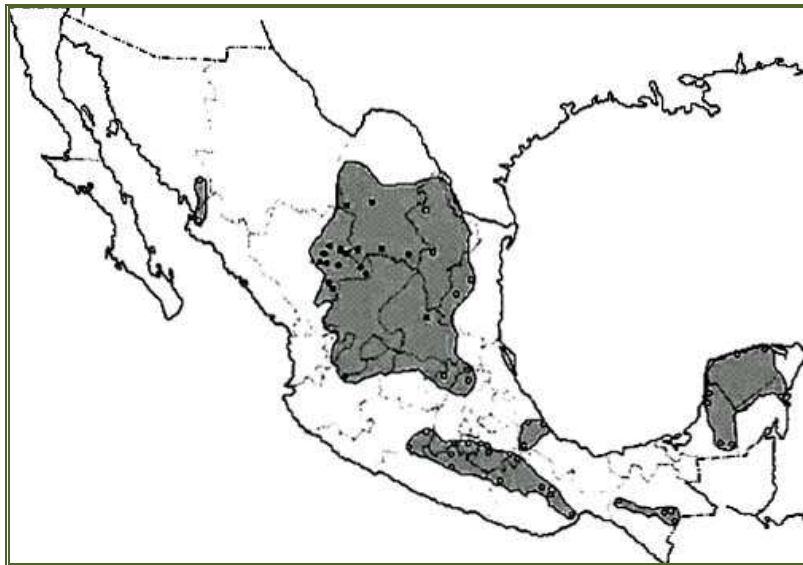


Figura 5. Distribución geográfica aproximada de *Lippia graveolens*. Las áreas en color gris indican los principales lugares donde se encuentra *Lippia graveolens*, (SEMARNAT, 2001).

Existen pocos estudios publicados sobre la composición química y propiedades farmacológicas de aceite de orégano mexicano. A través de cromatografía de

gases, se ha encontrado que el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) posee un alto contenido de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados, siendo el carvacol, p-cimeno y timol los compuestos mayoritarios (Salgueiro y col., 2003). Se ha encontrado que el timol y carvacrol (Figura 6) son de especial interés debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, la duración de la luz del día, la temperatura, el estrés hídrico y el crecimiento de la planta afectan a la fase de desarrollo de la planta de orégano y a su composición. Recientemente, se informó que la humedad y el crecimiento de las plantas afectan en la composición de aceite esencial de orégano mexicano en las pruebas de campo. Los resultados experimentales indicaron que el crecimiento de las plantas tiene un efecto significativo sobre la composición esencial del orégano. Sin embargo, la cantidad de agua recibida por la planta no tiene un efecto significativo en la concentración de timol y carvacrol producido por la planta (Turgut y Silva, 2005).

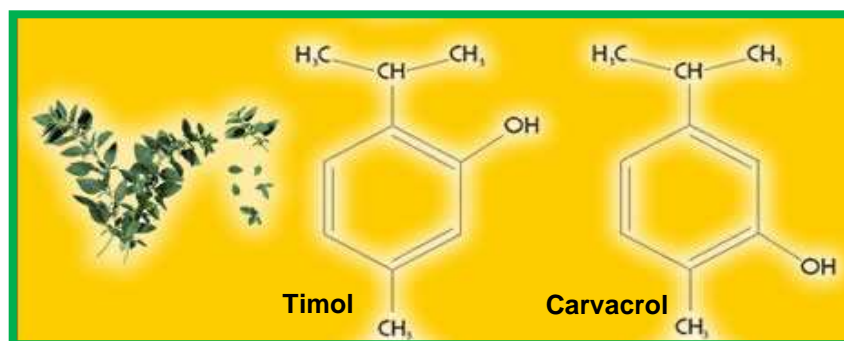


Figura 6. Principales compuestos del orégano mexicano (*Lippia graveolens*).

En la medicina tradicional, esta especie se emplea como antiséptico intestinal, antiespasmódico (Forestieri y col., 1996), analgésico, antiinflamatorio, antipirético (Cáceres y col., 1993), abortivo (Domínguez y col., 1989) y para el tratamiento de desórdenes menstruales (Compadre y col., 1986) y diabetes (Morton, 1981). De manera adicional, Salgueiro y colaboradores (2003) determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial demostrando una actividad significativa contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos y levaduras. Con respecto a

otros constituyentes, se han aislado los flavonoides naringenina y pinocembrina, el naftoquinoides lapaquenol (Domínguez y col., 1989), y diez iridoides (Rastrelli y col., 1998).

En lo que respecta a la modulación de sistemas antioxidantes, en un estudio realizado en ratones tratados vía intragástrica con timol (50-200 mg/kg peso corporal) o carvacrol (50-200 mg/kg), una vez al día por 7 días, se encontró un incremento significativo de 1.3-1.9 veces de las actividades de CYP450 1A, GST y NQO1 con timol (200 mg/kg) y de 1.3-1.7 veces con carvacrol (200 mg/kg). Estos resultados indican el efecto inductor de estos fenoles del orégano sobre enzimas de fase II (Sasaki y col., 2005). Sin embargo, poco se sabe del efecto inductor de otros compuestos también presentes en el orégano.

Como puede apreciarse, la caracterización química de *Lippia graveolens* no es extensa y son más escasos los reportes de las actividades biológicas. Considerando que en los últimos años el orégano europeo ha desplazado al orégano mexicano en el mercado internacional, un estudio sistemático y multidisciplinario de *Lippia graveolens* podría conferirle un valor agregado, además de abrir la posibilidad de comercializar no sólo las hojas o el aceite esencial sino también productos derivados de los extractos polares. En este sentido la caracterización química, biológica y toxicológica de los otros extractos libres de los componentes característicos del aceite esencial sin duda alguna contribuirá no sólo a la caracterización de los componentes del orégano sino también al aislamiento de compuestos potencialmente quimioprotectores.

III. HIPÓTESIS

Diversos extractos del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) contienen varios compuestos como los polifenoles, entre otros, capaces de inducir sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) y de modular el perfil de lípidos y glucosa en suero de ratas Sprague-Dawley.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar el efecto biológico de los extractos acuoso, butanólico, metanólico y total de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en ratas Sprague-Dawley.

IV.2 Específicos

- Evaluar el efecto de la administración intragástrica de diferentes extractos de orégano mexicano sobre la inducción de sistemas antioxidantes enzimáticos (GST y GPx) y no enzimáticos (GSH) en los diferentes órganos de ratas Sprague-Dawley.
- Identificar el efecto biológico de la administración intragástrica de diferentes extractos de orégano mexicano sobre los niveles de glucosa y perfil de lípidos en el suero de ratas Sprague-Dawley.
- Determinar el extracto y la dosis con mayor potencial biológico, dentro de los parámetros a evaluar.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Químicos

Los reactivos que se utilizaron en las determinaciones enzimáticas incluyeron: El ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB), 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB), dimetil sulfóxido (DMSO) grado HPLC, L-glutatión reducido (GSH) 99%, glutatión reductasa (GR), hidroxicumeno, nicotín-adenín dinucleótido fosfato (NADP) y Tritón X-100 fueron de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Los siguientes solventes y reactivos para las determinaciones enzimáticas como acetona, metanol, acetonitrilo, ácido tricloro-acético (TCA), albúmina sérica bovina (BSA), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de potasio (KCl), ácido etilén diamino tetra acético (EDTA), etanol 100%, hexano, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Tris-HCl y sacarosa ultra pura fueron de la marca J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Los kits para determinar los niveles de glucosa, colesterol, colesterol HDL y triglicéridos se adquirieron de la marca Randox (Crumlin, Antrim, RU). El kit para la cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) fue de la marca Pierce, Inc. (Rockford, IL, EUA).

V.1.2 Biológicos

V.1.2.1 Extractos

Los diversos extractos (acuoso, metanólico, butanólico y total) de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) fueron proporcionados por el Laboratorio de Química de Nutracéuticos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la UAQ y se prepararon de acuerdo a procedimientos ya estandarizados.

Para lo anterior, se colectaron muestras de *Lippia graveolens* en etapa de floración en la localidad de San Juan Raya del estado de Puebla. Las muestras se secaron bajo sombra y para eliminar los extractos esenciales, diez gramos de planta se molieron en un mortero y se extrajeron con Soxhlet usando inicialmente hexano-acetona 1:1 como disolvente. Una vez recuperado el extracto, se continuó con las diversas extracciones como se indica más adelante.

V.1.2.2 Animales

Para este estudio se emplearon 56 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley de 4 semanas de edad con pesos de 80 a 90 gramos, las cuales se adquirieron del bioterio Harlan de México S.A. de C.V. Las ratas se alojaron en jaulas de acrílico (12 ratas por jaula), bajo condiciones controladas de humedad ($50 \pm 10\%$), ciclos día/noche de 12/12 horas y temperatura ambiente ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Los animales se aclimataron durante siete días con agua y alimento *ad libitum* y se dividieron al azar en los diferentes grupos experimentales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de animales por dosis y extracto

Extracto/Dosis suministrada	Control negativo	Control positivo*	Extracto acuoso	Extracto butanólico	Extracto metanólico	Extracto total
0 mg/Kg	4	X	X	X	X	X
50 mg/Kg	X	X	4	4	4	4
100 mg/ kg	X	X	4	4	4	4
200 mg/Kg	X	4	4	4	4	4
Total de ratas por extracto	4	4	12	12	12	12

*Como control positivo o inductor de enzimas de fase II se empleó timol a una concentración de 200 mg/Kg, de acuerdo a lo reportado por la literatura (Sasaki y col., 2005)

V.2 Métodos

V.2.1 Preparación de los extractos de orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

El orégano mexicano *Lippia graveolens* se sometió a una extracción por el método Soxhlet con hexano-acetona, seguida de metanol. El extracto metanólico (EM) se particionó con n-butanol (EB) y agua (EA) para obtener los extractos correspondientes; así como también se obtuvo un extracto metanólico sin desengrasar (ET) y un extracto de aceite esencial (EAE), el cual no fue evaluado en este estudio. Los diversos extractos se concentraron al vacío a sequedad y se almacenaron protegidos de la luz.

V.2.2 Administración de los extractos a los grupos experimentales

Los extractos de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se resuspendieron en agua potable y se protegieron de la luz. Los extractos se administraron de forma intragástrica cada tercer día durante dos semanas a las concentraciones de 50, 100 y 200 mg/Kg de peso corporal. Al grupo control negativo se le administró únicamente agua vía intragástrica y al grupo control positivo se le administró timol a una dosis de 200 mg/Kg, según lo reportado en la literatura (Sasaki y col., 2005).

V.2.3 Sacrificio y obtención de muestras

Todos los animales se sacrificaron por anestesia con éter etílico 24 horas después de la última administración, obteniéndose muestras de sangre por punción cardiaca a partir de los animales en ayuno por 8 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención de suero y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Para tener acceso a las vísceras abdominales se procedió a realizar una incisión sobre la línea alba del plano muscular a lo largo de todo el abdomen y tras separar las dos partes de la incisión se extirpó el hígado, los riñones, el pulmón, el

intestino delgado y el colon o intestino grueso desde ciego hasta recto. Los tejidos se lavaron cuidadosamente con solución fisiológica salina fría, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C para su posterior análisis.

V.2.4 Preparación de citosoles para la determinación de GSH y GST

Se pesaron 0.75 g de cada órgano en tubos cónicos y se les agregó una solución amortiguadora de tris/sacarosa pH 8.2 a razón de cuatro veces su peso (3 mL de solución amortiguadora). Posterior a esto, las muestras se homogenizaron con la ayuda de un Polytron (Kinematica, Suiza) hasta que no fueron visibles ningún grumo de tejido; los homogenados se centrifugaron por 20 minutos a $8,750\text{ g}$ en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania) a 4°C . Al término de la centrifugación, el sobrenadante se removió cuidadosamente usando una pipeta Pasteur y se transfirió en tubos de policarbonato para centrifugarse nuevamente por una hora a $100,000\text{ g}$ a 4°C en una ultra centrífuga Beckman Optima L-90K (Beckman, EUA). Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf, los cuales se almacenaron a -70°C hasta su análisis (Ramos-Gomez y col., 2001).

V.2.5 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH) por medio de ácido 5,5'-ditiol-2-nitrobenzoico (DTNB)

La concentración de GSH se determinó por el método de Ellman (1959), basado en la habilidad del grupo SH para reducir el ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-thio-2-nitrobenzoico (TNB), empleándose los siguientes reactivos: solución amortiguadora Tris/EDTA a un pH de 8.2, una solución madre de DTNB 2.46 mM, solución madre de GSH 0.6 mM (que se utilizó para realizar la curva estándar), TCA al 20% y metanol. A continuación se describe el proceso que se llevó a cabo para la determinación de GSH.

V.2.5.1 Procedimiento para realizar la curva estándar de GSH

La curva estándar se realizó a partir de la solución madre de GSH (0.6 mM), la cual se preparó pesando 1.843 mg de GSH y se disolvió con 10 mL de solución amortiguadora Tris/EDTA. Para la solución madre de DTNB (2.46 mM) se pesaron 24.3 mg y se disolvieron en 25 mL de metanol. En el Cuadro 2 se muestran las soluciones y el volumen que se añadió de que cada una para realizar la curva estándar. Finalmente, las muestras se dejaron reposar durante 5 minutos y se leyeron a 412 nm en un lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Cuadro 2. Orden de adición de reactivos para realizar la curva estándar de GSH

Solución amortiguadora tris/EDTA (μL)	Solución madre de GSH (μL)	Metanol (μL)	DTNB (μL)	Concentración final de GSH (μM)
150	0	130	20	0
150	10	120	20	10
150	20	110	20	20
150	30	100	20	30
150	40	90	20	40
150	50	80	20	50
150	60	70	20	60
150	70	60	20	70
150	80	50	20	80
150	90	40	20	90
150	100	30	20	100

V.2.5.2 Procedimiento para precipitar las proteínas de los citosoles muestra

Se utilizaron citosoles concentrados de las muestras, a los cuales se les precipitó previamente la proteína con el siguiente procedimiento: En un tubo Eppendorf se adicionaron 120 μL de agua destilada, 150 μL de citosol concentrado y 30 μL de

TCA al 20%. A continuación la mezcla se dejó reposar por 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugó a 8000 g por 5 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf.

V.2.5.3 Procedimiento para la determinación espectrofotométrica

Una vez precipitadas las proteínas, se procedió a llevar a cabo la determinación espectrofotométrica. En el Cuadro 3 se muestra el orden en el cual se agregaron los reactivos en la microplaca. Posteriormente, se dejó reposar durante 5 minutos y se leyó a 412 nm en el lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Cuadro 3. Orden de adición de reactivos para la determinación de GSH

Reactivo	Volumen (μL)
Solución amortiguadora tris/EDTA	150
Muestra (sobrenadante)	50
Metanol	80
DTNB	20

La concentración de GSH en las muestras se determinó extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración realizada previamente y los resultados se expresan en μ M/mg de proteína (de citosoles sin precipitación proteica).

V.2.6 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST): CDNB

Estas enzimas juegan un papel importante en la desintoxicación y biotransformación de una gran variedad de xenobióticos, incluidos varios carcinógenos y un número considerable de fármacos por conjugación con GSH.

Este método se basa en la reacción catalizada por esta enzima entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro,-2,4-dinitrobenceno), el cual tiene un amplio intervalo para detectar las diferentes isoenzimas (Habig y col., 1974).

V.2.6.1 Procedimiento para el ensayo enzimático de GST

Antes de realizar el análisis se prepararon las soluciones de trabajo; para la solución de trabajo de GSH (3 mM) se diluyó 240 μ L de solución madre de GSH 150 mM en 11.76 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M pH 6.5 y para la solución trabajo de de CDNB (2 mM) se diluyó 567 μ L de solución madre de CDNB 60 mM en 16.43 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M pH 6.5. Para la determinación de esta enzima se prepararon diluciones a partir de los citosoles concentrados en solución amortiguadora de fosfatos de sodio. En el Cuadro 4 se muestra el orden en el que se adicionaron los reactivos para la determinación de GST.

Cuadro 4. Orden de adición de reactivos para el ensayo enzimático para GST

Reactivos	Volumen (μL)
Dilución apropiada del citosol	50
Solución de trabajo de GSH 3 mM	100
Solución de trabajo de CDNB 2 mM	150

La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima de GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 $^{\circ}$ C en un período de 2 minutos de reacción en el lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), obteniéndose lecturas cada 20 segundos. Los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1.

La actividad de GST se expresó en nmol de producto conjugado por mg de proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{nmol}}{(\text{mg}) (\text{min})} = \frac{\Delta (\text{abs min 2} - \text{abs min 1})}{(\text{mg de proteína}) (0.0096)}$$

Donde:

abs min 2: es la absorbancia de la muestra a 340 nm en el minuto 2 de reacción.

abs min 1: es la absorbancia a 340 nm al minuto 1 de reacción.

mg proteína: mg de proteína de la muestra.

0.0096: es el coeficiente de extinción de CDNB ($\text{nM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

V.2.7 Preparación de citosoles para la determinación de glutatión peroxidasa (GPx).

Para la determinación de GPx se pesaron 0.5 g de órgano en un tubo cónico, se añadieron 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, que contenía EDTA 0.5 mM, Tritón 0.5% y etanol 0.01 mL/mL, posteriormente se homogenizaron con la ayuda de un polytrón (Kinematica, Suiza). Los homogenados se centrifugaron a 8000 g durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga Univers al 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf y se almacenó a -70 °C hasta su análisis.

V.2.7.1 Determinación enzimática de glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPX se midió por el método de Plagia y Valentine (1976), el cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPX, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa y NADPH. Para esta determinación las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: en un tubo Eppendorf se colocaron 840 µL de solución amortiguadora de reacción, 50 µL cocktail de GSH/GPx (42 mM GSH, 10 unidades/mL de GPx), 50

μL muestra y 50 μL NADPH; justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 10 μL de hidroxicumeno (50 mM) y se mezclaron bien. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C, con una frecuencia de mediciones cada 9 segundos por un tiempo de corrida de 3 minutos en el lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Nota: No debió transcurrir más de 10 segundos entre la adición de hidroxicumeno y la lectura de la muestra en el espectrofotómetro.

La actividad de GPx (nmol/mg de proteína X min) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{(\text{mg})(\text{min})} = \frac{([Pendiente\ de\ la\ muestra] - [Pendiente\ del\ blanco])(Factor\ de\ dilución)}{(6.22)(Vol.\ de\ la\ muestra\ en\ mL)}$$

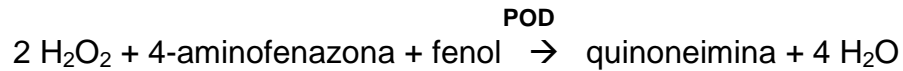
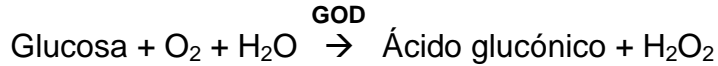
Donde: 6.22 es el coeficiente de absortividad molar del NADPH ($\text{nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

V.2.8 Evaluación de la concentración de glucosa y perfil lipídico en suero

V.2.8.1 Glucosa

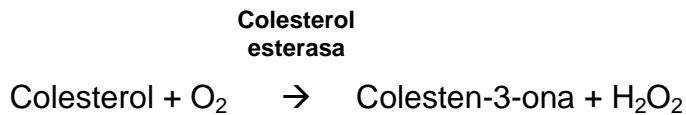
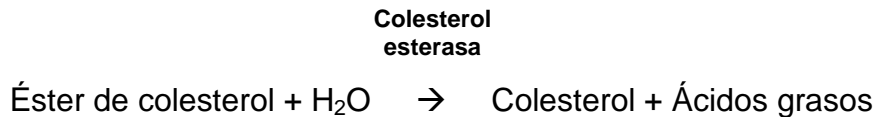
La medición de glucosa en suero o plasma es importante en el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos del metabolismo de hidratos de carbono tales como la diabetes mellitus, hipoglucemia neonatal y de los islotes pancreáticos de carcinoma de células. Por ello, los niveles de glucosa en suero de ratas tratadas con los extractos de orégano se midieron con el kit de glucosa GLUC-PAP de la marca Randox; donde la glucosa se determinó a partir de la oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa (GOD) y el H_2O_2 formado reacciona, en virtud de la catálisis de la peroxidasa (POD), con fenol y 4-aminofenazona para formar un

compuesto quinoneimina color rojo-violeta que se emplea como indicador; de acuerdo a la siguiente reacción:



V.2.8.2 Colesterol

La mayor parte del colesterol en el plasma procede del hígado, y su concentración igualmente es el resultado del equilibrio entre la síntesis y el catabolismo que tiene lugar en este órgano. Se sabe, además, que diversos compuestos fenólicos alteran los niveles de colesterol en plasma. Por ello, los niveles de colesterol se midieron con el kit de COLESTEROL de la marca Randox; donde el colesterol se determinó después de la hidrólisis enzimática y oxidación. El indicador quinoneimina se forma a partir de H_2O_2 y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y la enzima peroxidasa, según lo muestran las siguientes reacciones:

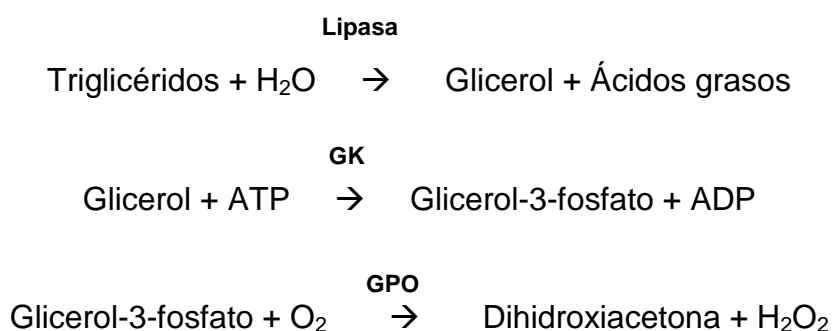


V.2.8.3 Colesterol HDL

Las lipoproteínas son proteínas de la sangre cuyo propósito fundamental es transportar el colesterol y otras grasas insolubles. Se utilizan como marcadores que indican los niveles de lípidos dentro del torrente sanguíneo. Las HDL son portadoras de colesterol, se producen en el hígado y en menor medida en los intestinos. Se sugiere que el propósito de las HDL es retirar el colesterol de los tejidos periféricos y transportarlo al hígado para su excreción. Las HDL también ejercen un efecto protector, impidiendo la captación celular de colesterol y lípidos (Pagana y Pagana, 2001). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de iones de magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determina en la fracción de HDL (lipoproteína de alta densidad) que queda en el sobrenadante mediante un kit de la marca Randox.

V.2.8.4 Triglicéridos

Los ácidos grasos son convertidos en triglicéridos con la finalidad de ser transportados y almacenados. Los triglicéridos se transportan por la sangre en forma de micelas, que son estabilizadas mediante capas externas de proteínas y fosfolípidos, denominados quilomicrones, los cuales son llevados desde el intestino a la sangre a través de la linfa (Balletbó y col., 2001). Los triglicéridos se determinaron mediante el kit de TRIGLICÉRIDOS de la marca Randox a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas dando como resultado el indicador quinoneimina formada por el H_2O_2 , 4-aminofenazono y 4-clorofenol, bajo la actividad catalítica de la peroxidasa (POD); según la siguiente reacción:





V.2.9 Cuantificación de proteína total por el método del ácido bicinconínico (BCA)

La cuantificación de proteínas de los homogenados citosólicos se realizó por el método de BCA, utilizando el kit de la marca Pierce y empleando BSA como estándar. Este método combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la alta sensibilidad y selectiva detección colorimétrica del catión cobre (Cu^{+1}), utilizando únicamente como reactivo BCA. El color púrpura, producto de la reacción, se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cobre.

Para la cuantificación se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5. Posteriormente, se colocaron 50 μL del citosol diluido en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 250 μL de la solución de trabajo para la determinación de proteína en cada pozo. La placa se incubó por una hora a temperatura ambiente o 30 minutos a 37 °C. Finalmente, las muestras se midieron en un lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a una longitud de onda de 562 nm. Los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1.

V.2.10 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (EE) y se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnett o Dunn para la comparación entre los grupos tratados con cada extracto y el grupo control (negativo). La prueba de Tukey se empleó para la comparación múltiple entre grupos. En todos los casos se empleó un nivel de

significancia de $P < 0.05$. Los análisis se realizaron en el programa estadístico Sigma Stat versión 2.0 (1992 - 1997).

VI. RESULTADOS

VI.1 Concentración de glutatión reducido (GSH) en ratas Sprague-Dawley tratadas con el extracto acuoso, butanólico, metanólico y total de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

El GSH es el antioxidante no enzimático más relevante, aunque no tiene un papel directo con los xenobióticos causantes o promotores del estrés oxidativo en las células, mantiene el equilibrio redox y a su vez participa en las reacciones antioxidantes proporcionando reductores equivalentes. El GSH en pocas palabras tiene una relación directa con las enzimas de fase II en la formación de complejos capaces de biotransformar a los xenobióticos para ser desechados o eliminados por las diversas vías como lo son: orina, sudor, heces, lágrimas, etc.

VI.1.1 Concentración de glutatión reducido (GSH) en hígado inducido con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Como se sabe, el hígado está implicado en el metabolismo normal tanto de nutrientes como de aquellos xenobióticos que han podido llegar hasta él. La capacidad metabólica viene determinada por los diferentes sistemas enzimáticos aportados por mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico. Tales sistemas enzimáticos presentan algunas diferencias de una zona a otra, que explican la susceptibilidad específica ante los efectos de las deficiencias nutricionales, de la presencia de xenobióticos o de los desórdenes circulatorios. En la Figura 7 se observa la concentración de GSH obtenido en el hígado de ratas tratadas durante dos semanas con los diferentes extractos.

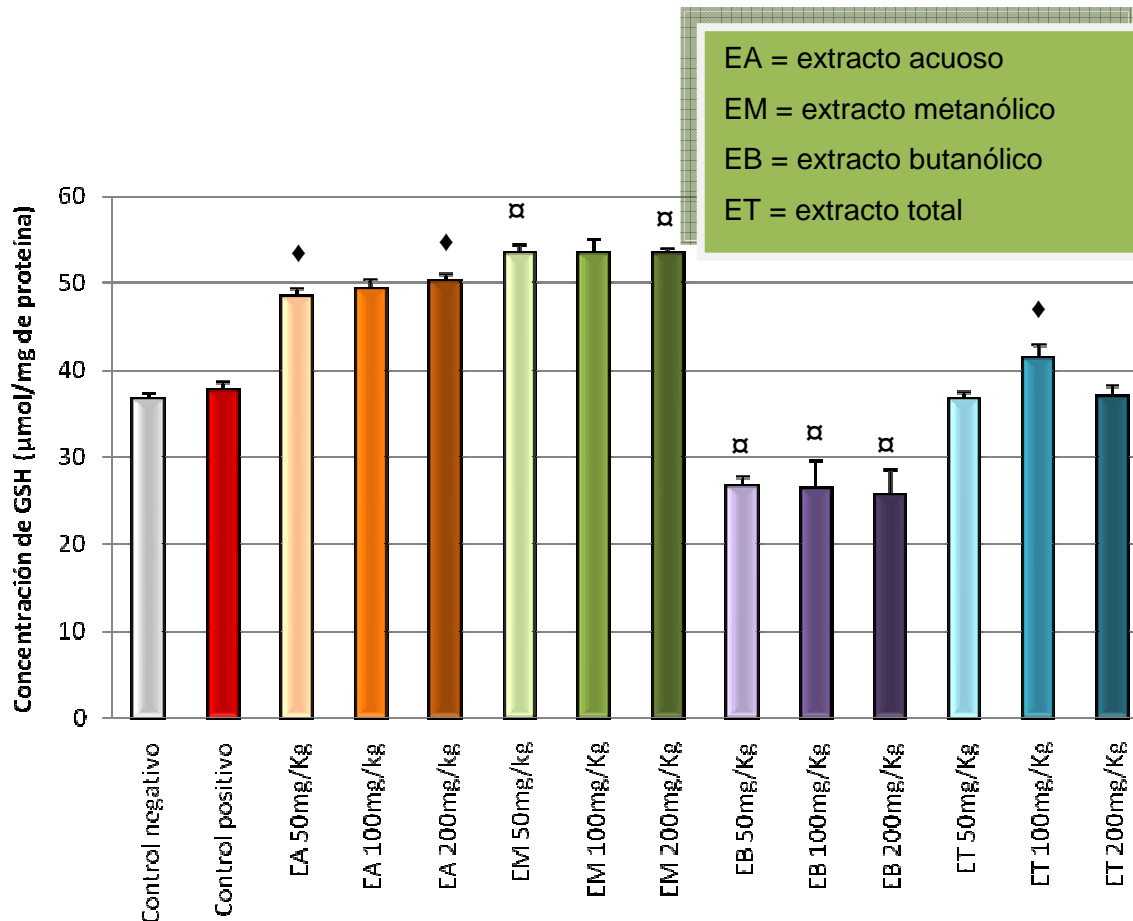
El extracto acuoso incrementó significativamente los niveles hepáticos de GSH del 32.2 - 37.1% de manera dosis-dependiente, comparada con el control negativo. Para el extracto metanólico, los niveles de GSH se incrementaron

significativamente en un 45.8% independientemente de la dosis. Para el extracto butanólico no se presentó un incremento en los niveles de GSH, siendo inclusive menores a las concentraciones encontradas en el control negativo. El extracto total sólo presentó un incremento del 13.3% en los niveles de GSH con respecto al control negativo a la dosis de 100 mg/kg del extracto total. Inesperadamente, el compuesto timol no indujo los niveles de GSH a la dosis empleada en este estudio.

De acuerdo a los resultados anteriores, el extracto acuoso mostró el mayor efecto inductor en los niveles de GSH en hígado comparado con los otros extractos y el control positivo. Para fines comparativos, los resultados de la concentración de GSH en hígado se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 5.

VI.1.2 Concentración de glutatión reducido (GSH) en riñón inducido con los diferentes extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

El riñón también es un órgano diana de diversos agentes tóxicos que provocan perturbaciones en su comportamiento fisiológico, que algunas veces se traducen en lesiones graves. Es por ello que este órgano desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal total de los seres vivos. Además, este órgano desempeña una serie de funciones biológicas importantes: excreción de metabolitos de desecho, regulación del volumen del fluido extracelular, concentración de electrolitos y equilibrio ácido-base, etc. En la Figura 8 se muestran los resultados de la concentración de GSH obtenidos en riñón de ratas tratadas durante dos semanas con los diferentes extractos.



Concentración de los extractos orgánicos de orégano *Lippia graveolens*

Figura 7. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

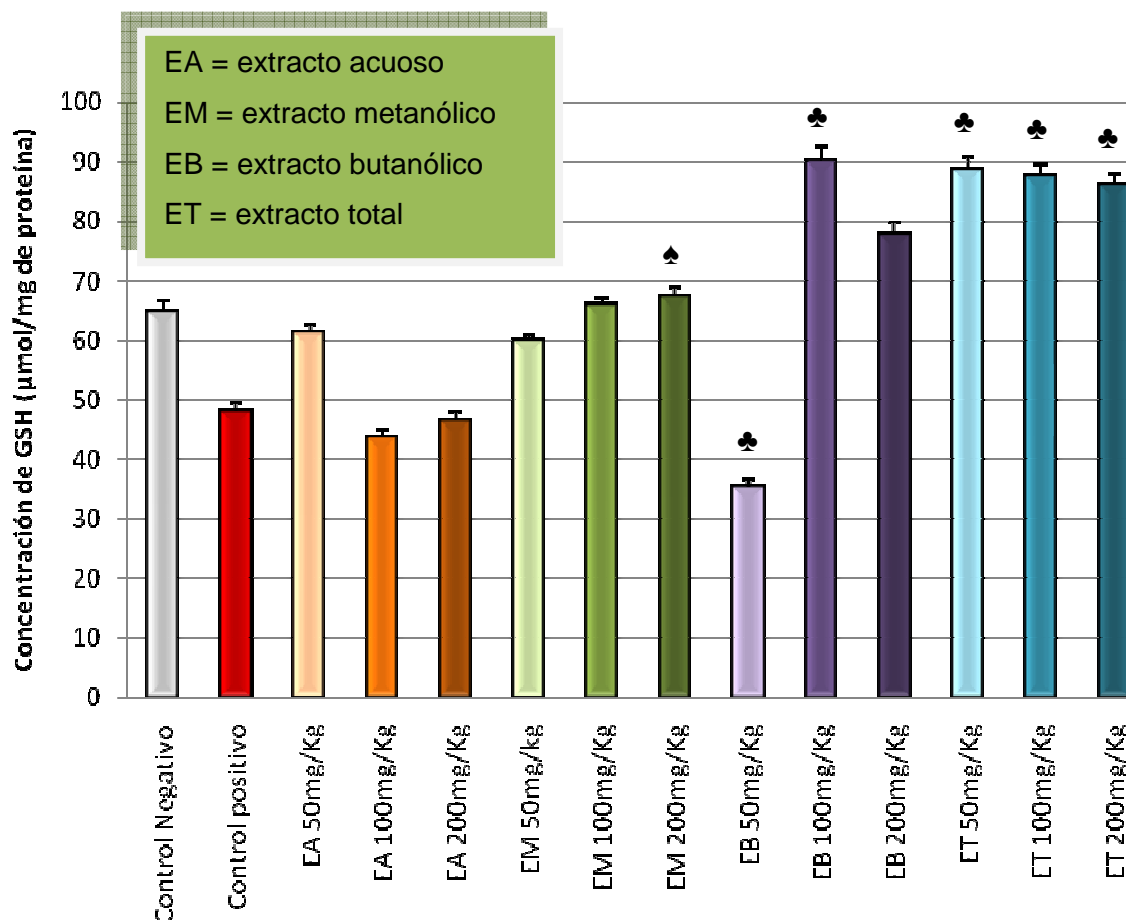
α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

En riñón, los niveles de GSH se incrementaron únicamente en un 1.7 y 4.1% a concentraciones de 100 y 200 mg/Kg del extracto metanólico, respectivamente; mientras que el extracto butanólico incrementó en un 39.3 ($P < 0.05$) y 20.2% la concentración de GSH, respectivamente. Para el extracto total, los niveles de GSH se incrementaron en un 33 – 37%, siendo estadísticamente significativo a la dosis de 200 mg/Kg, comparado con el control negativo. Contrario a lo observado en hígado, los extractos acuosos no incrementaron la concentración de GSH en riñón. De manera similar, el timol usado como control positivo no indujo los niveles de GSH como se esperaba, siendo incluso menor al control negativo (Figura 8).

Para fines comparativos, los resultados de la concentración de GSH en riñón se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 5.

Durante la realización de este proyecto, el análisis y cuantificación de GSH en los órganos y tejidos como colon distal y proximal, así como pulmón e intestino delgado, se vio interrumpido por fallas eléctricas en el área donde se tenían almacenados, provocando un descongelamiento de los órganos; teniendo en cuenta que el GSH tiene un mecanismo de conjugación irreversible y es demasiado sensible a los cambios de temperatura, estas muestras se perdieron. Se trató de rescatar todos los órganos almacenándolos en los congeladores de refrigeradores convencionales a -10°C pero ninguna de estas muestras se pudo recuperar para el análisis anterior.



Concentración de los extractos orgánicos de orégano *Lippia graveolens*

Figura 8. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) en riñón después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

♠ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

♣ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo al método Holm-Sidak ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Concentración de GSH en los diferentes órganos de ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

	Concentración de GSH [$\mu\text{mol}/(\text{mg de proteína})$]	
	Hígado	Riñón
Control negativo	36.568 \pm 1.832	64.726 \pm 4.820
Control positivo	37.703 \pm 2.394	48.112 \pm 3.437
Extracto acuoso		
50 mg/Kg	48.342 \pm 2.715 \blacklozenge	61.264 \pm 3.878
100 mg/Kg	49.240 \pm 2.411	43.614 \pm 4.009
200 mg/Kg	50.138 \pm 2.107 \blacklozenge	46.412 \pm 4.504
Extracto metanólico		
50 mg/Kg	53.324 \pm 2.698 \boxtimes	59.786 \pm 3.398
100 mg/Kg	53.345 \pm 2.057	65.837 \pm 3.810 \clubsuit
200 mg/Kg	53.365 \pm 1.416 \boxtimes	67.375 \pm 4.924
Extracto butanólico		
50 mg/Kg	26.629 \pm 3.051 \boxtimes	35.289 \pm 4.475 \clubsuit
100 mg/Kg	26.209 \pm 9.398 \boxtimes	90.151 \pm 6.768 \clubsuit
200 mg/Kg	25.478 \pm 7.715 \boxtimes	77.783 \pm 5.417
Extracto total		
50 mg/Kg	36.583 \pm 2.101	88.678 \pm 6.294 \clubsuit
100 mg/Kg	41.417 \pm 3.994 \blacklozenge	87.431 \pm 5.700 \clubsuit
200 mg/Kg	36.865 \pm 3.340	86.184 \pm 4.925 \clubsuit

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

\boxtimes Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

\blacklozenge Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

\clubsuit Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

\clubsuit Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo al método Holm-Sidak ($P < 0.05$).

VI.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuoso, butanólico, metanólico y total de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Esta familia de enzimas es capaz de neutralizar los sitios activos de las especies reactivas del oxígeno capaces de provocar el estrés oxidativo en las células, que es la principal fuente de las enfermedades crónico-degenerativas en los seres vivos. Estas enzimas generan compuestos menos reactivos o más hidrosolubles, lo que facilita su eliminación del organismo. La excreción de estos compuestos tóxicos previene las lesiones del ADN y la formación de aductos.

VI.2.1 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Innumerables reacciones bioquímicas se llevan en el hígado, donde se promueve, entre una de ellas, la biotransformación de todas aquellas sustancias xenobióticas que ingresan a nuestro cuerpo, por diversos complejos enzimáticos que en él se encuentran, entre ellos la glutatión-S-transferasa. A este respecto, se encontraron resultados favorables y alentadores en la inducción de esta enzima con los extractos orgánicos comparados con el control negativo (Figura 9). Para el extracto metanólico, la actividad de GST fue 11.1% mayor a la dosis de 200 mg/Kg; mientras que el extracto total incrementó la actividad de GST en 14.7 y 25.1% a las dosis de 50 y 100 mg/Kg, respectivamente, comparada con el grupo control negativo. Por el contrario, el extracto acuoso ejerció un efecto negativo sobre la actividad enzimática de GST. Para el control positivo (timol 200 mg/Kg) se presentó un nivel de inducción únicamente del 6.1% en comparación al control negativo.

Los resultados de la actividad enzimática de GST en hígado se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 6.

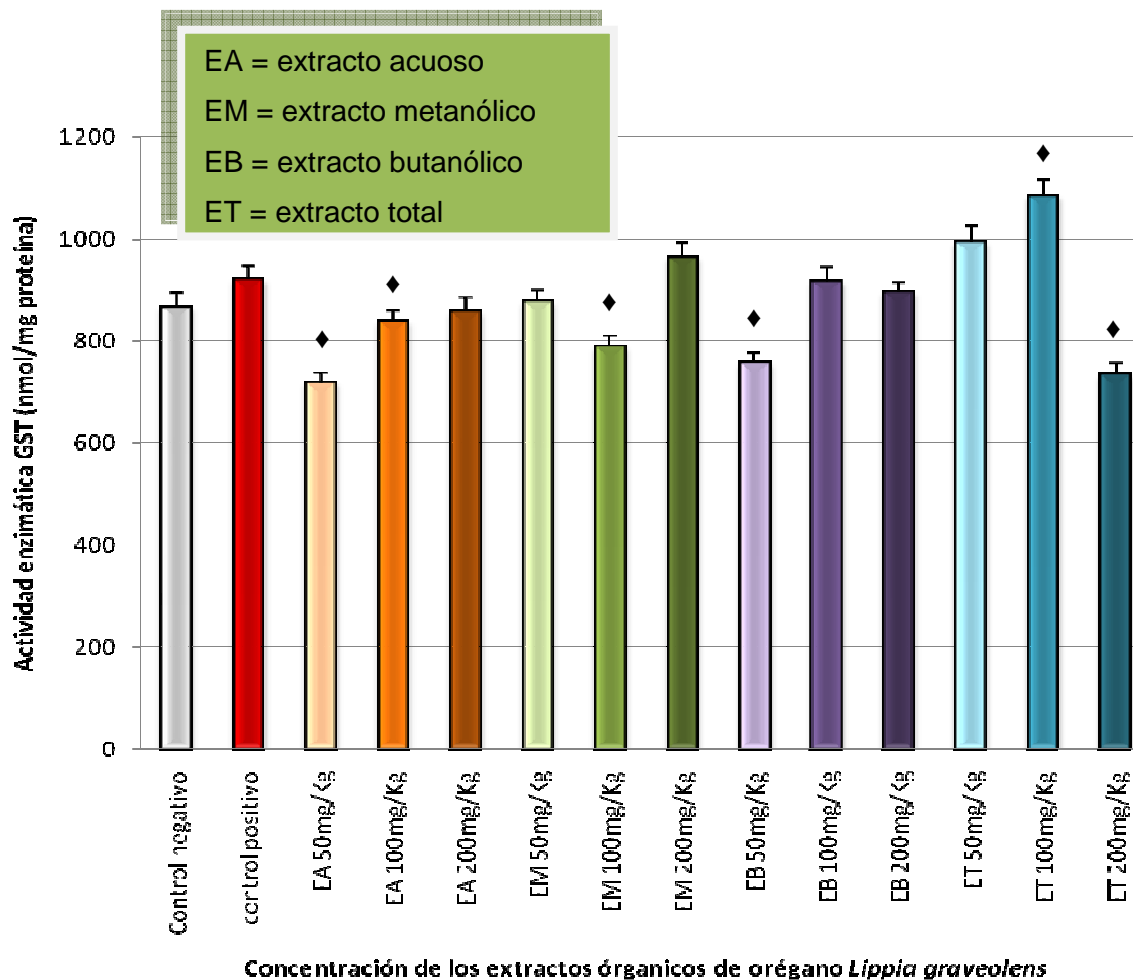


Figura 9. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en hígado después de dos semanas de tratamiento.

Control positivo: Timol (200 mg/Kg). Los valores representan la media \pm EE.

◆ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

VI.2.2 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

El riñón es uno de los principales “filtros” que retiene y biotransforma compuestos tóxicos transportados por la sangre a través de diversas reacciones bioquímicas llevadas a cabo por los diversos complejos enzimáticos de los seres vivos. Particularmente, este órgano es responsable de la excreción de aquellos compuestos ya biotransformados por los complejos enzimáticos. En la Figura 10 se muestra la actividad enzimática de GST determinada en riñón de los animales de experimentación al ser tratados con los diversos extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*, observándose una respuesta positiva y alentadora para los fines de esta investigación.

El extracto acuoso incrementó significativamente la actividad de GST renal en un 18.1 y 18.6% a las dosis de 50 y 100 mg/kg, respectivamente, comparada con el grupo control negativo; el extracto metanólico en un 18.1 y 22.4% a las dosis de 50 y 200 mg/kg, respectivamente ($P < 0.05$); mientras que el extracto butanólico incrementó significativamente la actividad en un 12.8% a dosis de 50 mg/Kg. Finalmente, el extracto total incrementó significativamente la actividad de GST a la dosis de 200 mg/Kg (14.2%), en comparación con el control negativo. De manera similar, el timol a 200 mg/Kg incrementó los niveles en un 18.1% en comparación con el control negativo.

Los resultados de la actividad enzimática de GST en riñón se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 6.

VI.2.3 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en pulmón por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

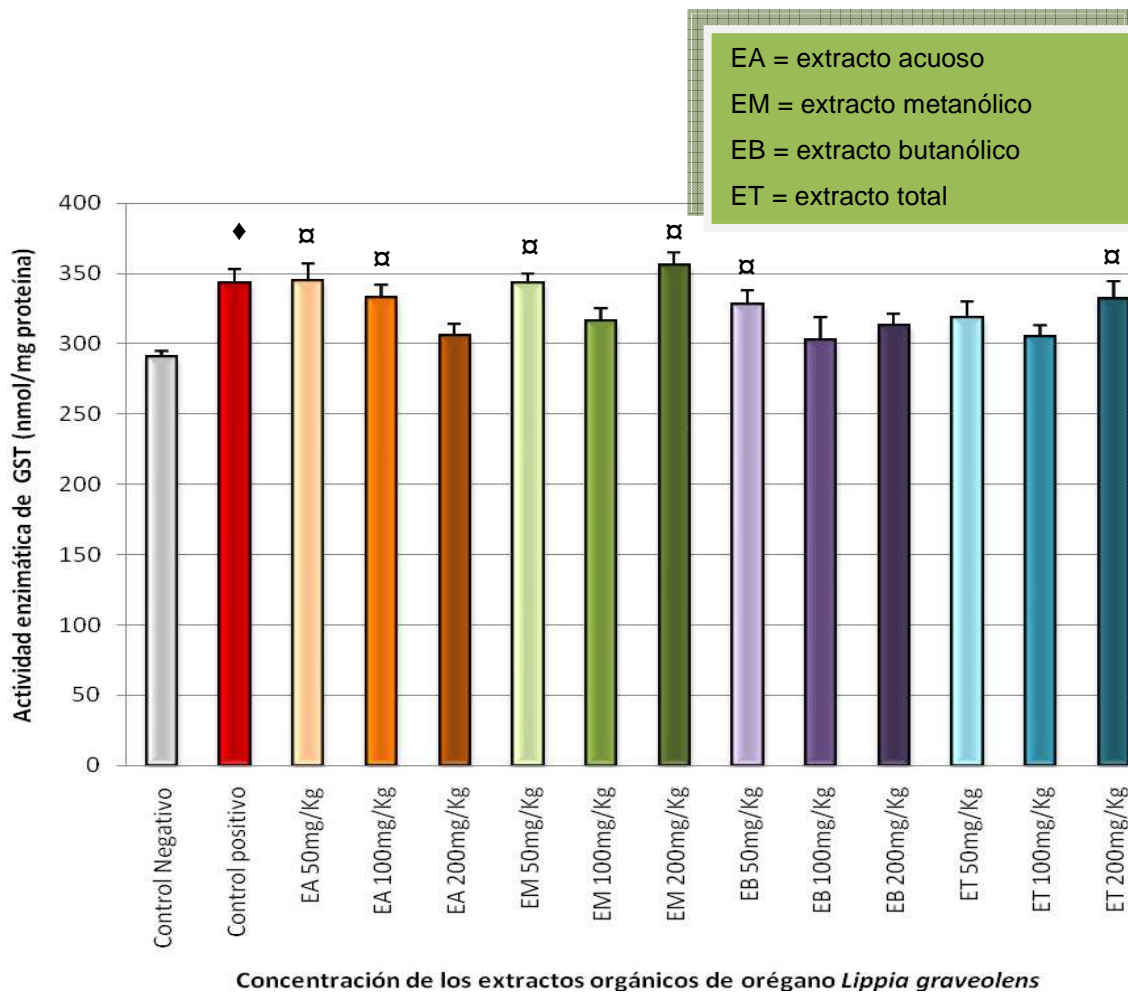


Figura 10. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en riñón después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

El pulmón desempeña diversas funciones metabólicas, además de intercambio de gases. Así mismo, el pulmón se encuentra continuamente expuesto a sustancias tóxicas a través del aire inhalado que podrían afectar estas funciones fisiológicas o metabólicas. Sin embargo, son escasas las investigaciones sobre la determinación de enzimas de fase II como de glutatión-S-transferasa en este órgano. Es por ello que en esta investigación se quiso indagar el efecto de los diversos extractos de orégano en la inducción de GST a nivel pulmonar.

En la Figura 11 se puede observar que, al igual que en el riñón, se obtuvo una respuesta positiva a nivel pulmonar, donde la actividad enzimática de GST inducida por el extracto acuoso a las dosis de 100 y 200 mg/Kg fue estadísticamente mayor (35.5 y 97.1%, respectivamente) a la del grupo control negativo; similarmente, a estas mismas dosis se observó un incremento del 68 y 28.2%, respectivamente, con el extracto butanólico. Por el contrario, las dosis de 50 y 100 mg/Kg del extracto metanólico (52.3 y 84.1%, respectivamente) incrementaron significativamente la actividad de GST de pulmón. Cabe resaltar que el extracto total mostró los mayores incrementos significativos en la actividad de la enzima GST en pulmón a las dosis de 50 (90.1%), 100 (86.4%) y 200 mg/Kg (82.7%), aún comparadas con la actividad del grupo control positivo (76.5%, $P < 0.05$).

Los resultados de la actividad enzimática de GST en pulmón se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 6.

VI.2.4 Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en intestino delgado por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

La presencia de xenobióticos a través del sistema digestivo tiene lugar principalmente por difusión pasiva.

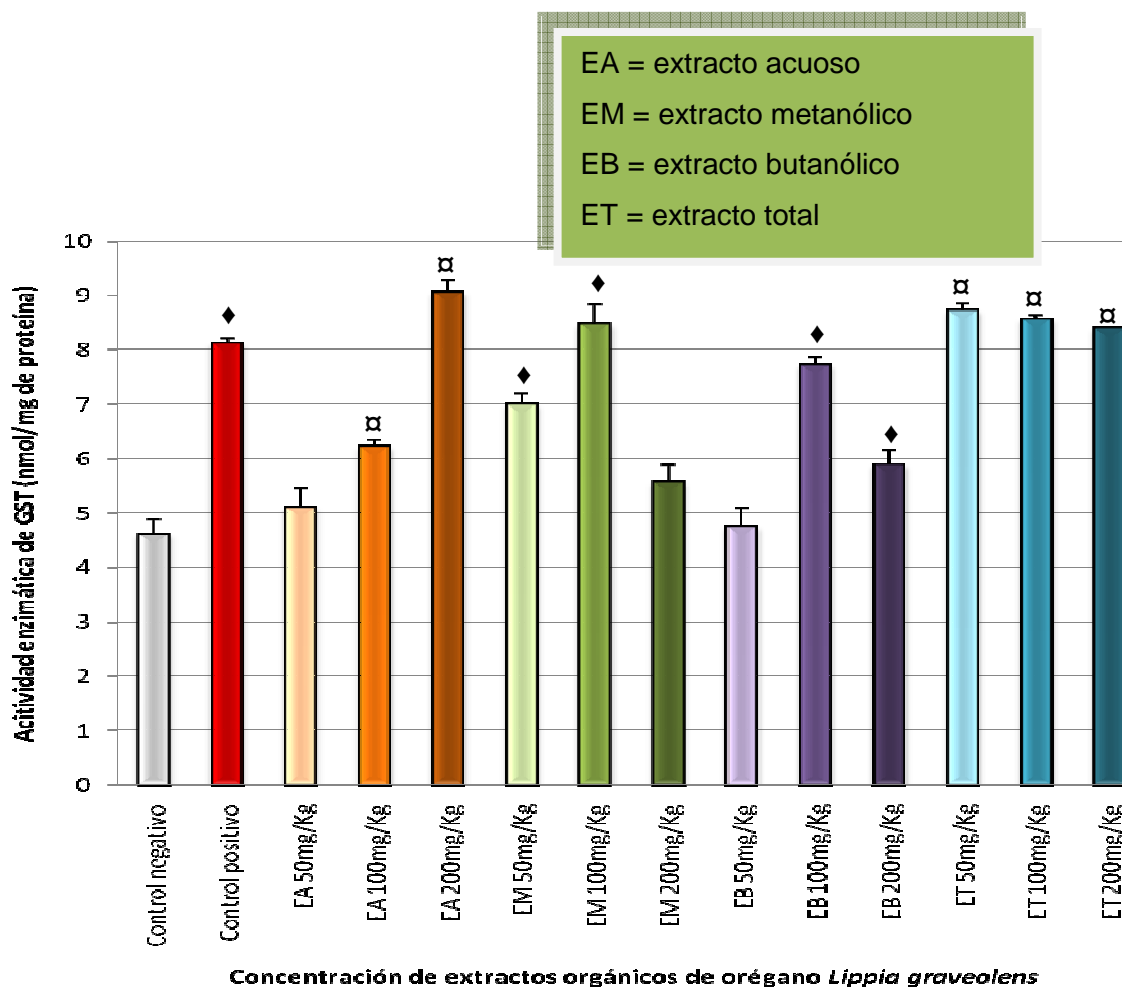


Figura 11. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en pulmón después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Bajo condiciones ordinarias, la absorción por boca y esófago suele ser poco significativa; sin embargo, a nivel del estómago e intestino ésta adquiere su importancia, debido a los valores especiales de su pH que determinan el grado de disociación molecular exhibidos por los compuestos iónicos débiles. Es por ello que en esta investigación se evaluó el efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* en la inducción de enzimas de fase II como lo es la GST en el intestino delgado.

En la Figura 12 se observa que el extracto acuoso incrementó significativamente la actividad enzimática en un 19 y 29.3% a las dosis de 50 y 200 mg/kg, respectivamente. Con el extracto metanólico se obtuvieron los mayores incrementos en la actividad enzimática de GST intestinal de manera dosis-dependiente (24.9, 47.7 y 51.6%, respectivamente), en comparación con los otros extractos y fue estadísticamente mayor a la del control negativo ($P < 0.05$). Independientemente de la dosis, el extracto butanólico incrementó significativamente la actividad de GST (27 – 31%) a las tres dosis. Por último, la actividad enzimática en intestino fue 32.5 y 20.3% mayor a la del control negativo con el extracto total a las dosis de 100 y 200 mg/Kg, respectivamente. En lo que respecta al timol, únicamente se observó una inducción en la actividad de GST del 12.7% en comparación al control negativo.

Los resultados de la actividad enzimática de GST en intestino delgado se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 6.

VI.2.5 Actividad enzimática de glutatión S-transferasa (GST) en intestino grueso por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

El intestino desempeña dos funciones fundamentales para la vida: la absorción e intercambio de nutrientes y la constitución de una barrera defensiva que impide la

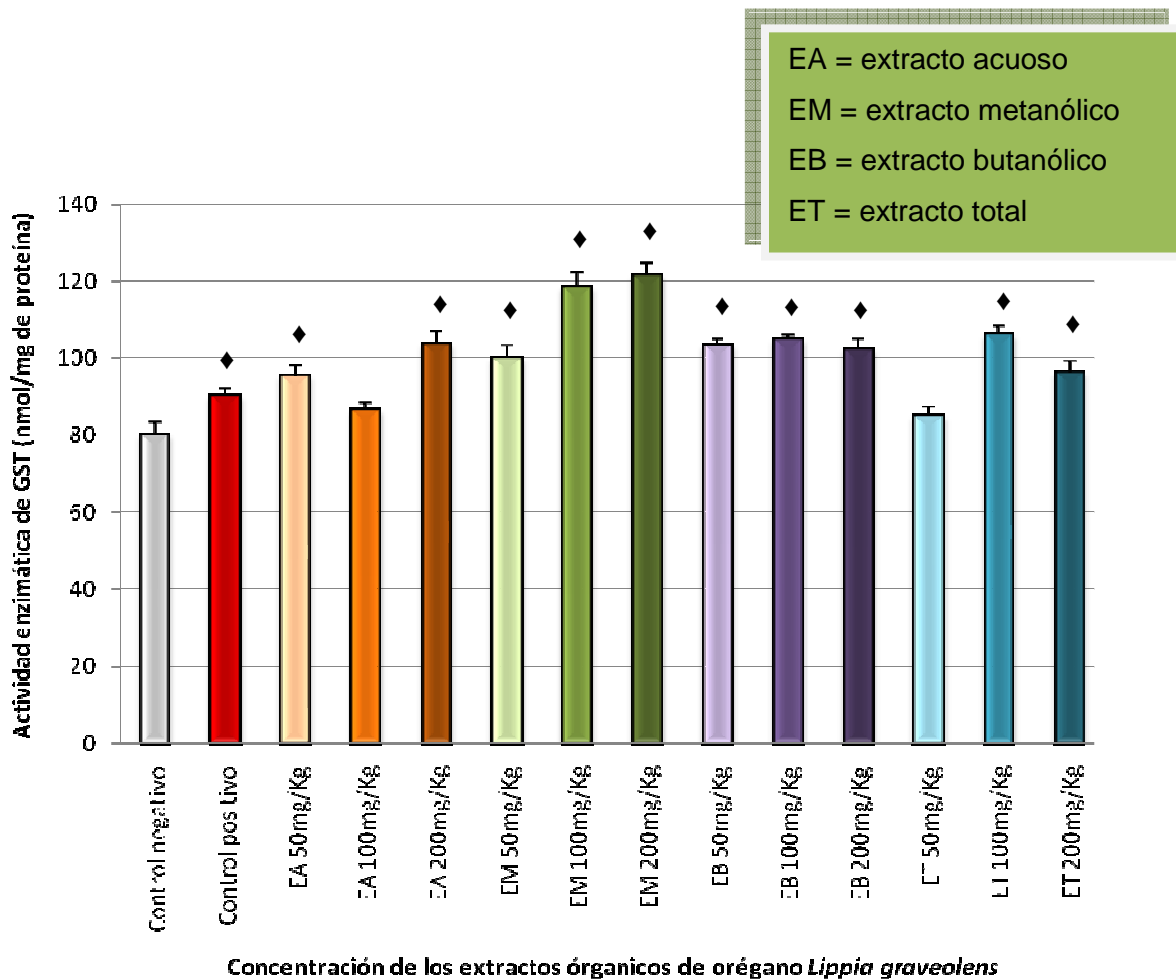


Figura 12. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en intestino delgado después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

entrada de sustancias potencialmente tóxicas o antígenos al interior del organismo. El intestino grueso comprende sucesivamente el ciego, el colon y el recto, para finalizar en el canal anal. A su vez, el colon se divide en zona distal o proximal lo que corresponde al colon descendente y ascendente, respectivamente. En esta investigación era importante conocer los niveles de respuesta en la inducción de enzimas antioxidantes de fase II como la GST en colon distal y proximal, ya que son una de las principales barreras con la que cuentan los seres vivos en la defensa de agentes tóxicos como las especies reactivas del oxígeno.

En la Figura 13 se presenta la actividad de GST en colon distal, donde el extracto acuoso a la dosis de 50 mg/Kg la actividad inducida fue de 22.6%, mientras que a dosis de 100 y 200 mg/Kg se incrementó significativamente la actividad en un 57.1 y 65.4%, respectivamente, comparada con la del control negativo, siendo éstas las respuestas más significativas en este órgano. Por otro lado, los extractos butanólico a la dosis de 50 mg/Kg y total a las dosis 100 y 200 mg/Kg incrementaron significativamente la actividad de GST en colon (56.1, 20.1 y 38.4%, respectivamente); mientras que, el timol (200 mg/Kg) indujo en un 3.4% la actividad de GST en colon en comparación con la del control negativo.

Para el colon proximal, los resultados se muestran en la Figura 14 donde se puede apreciar que la respuesta obtenida en la actividad enzimática de GST inducida fue menor que la obtenida en el colon distal, ya que únicamente se observó un incremento significativo del 19.6 y 16.6% para los extractos butanólico a la dosis de 50 mg/Kg y total a la dosis a 100 mg/Kg, respectivamente, respecto al control negativo (65 nmol/mg proteína*min). En cuanto al control positivo, el timol (200 mg/Kg) incrementó la actividad de GST en un 24%, siendo esta sección del intestino grueso la que presentó una mayor la inducción de GST por acción del timol.

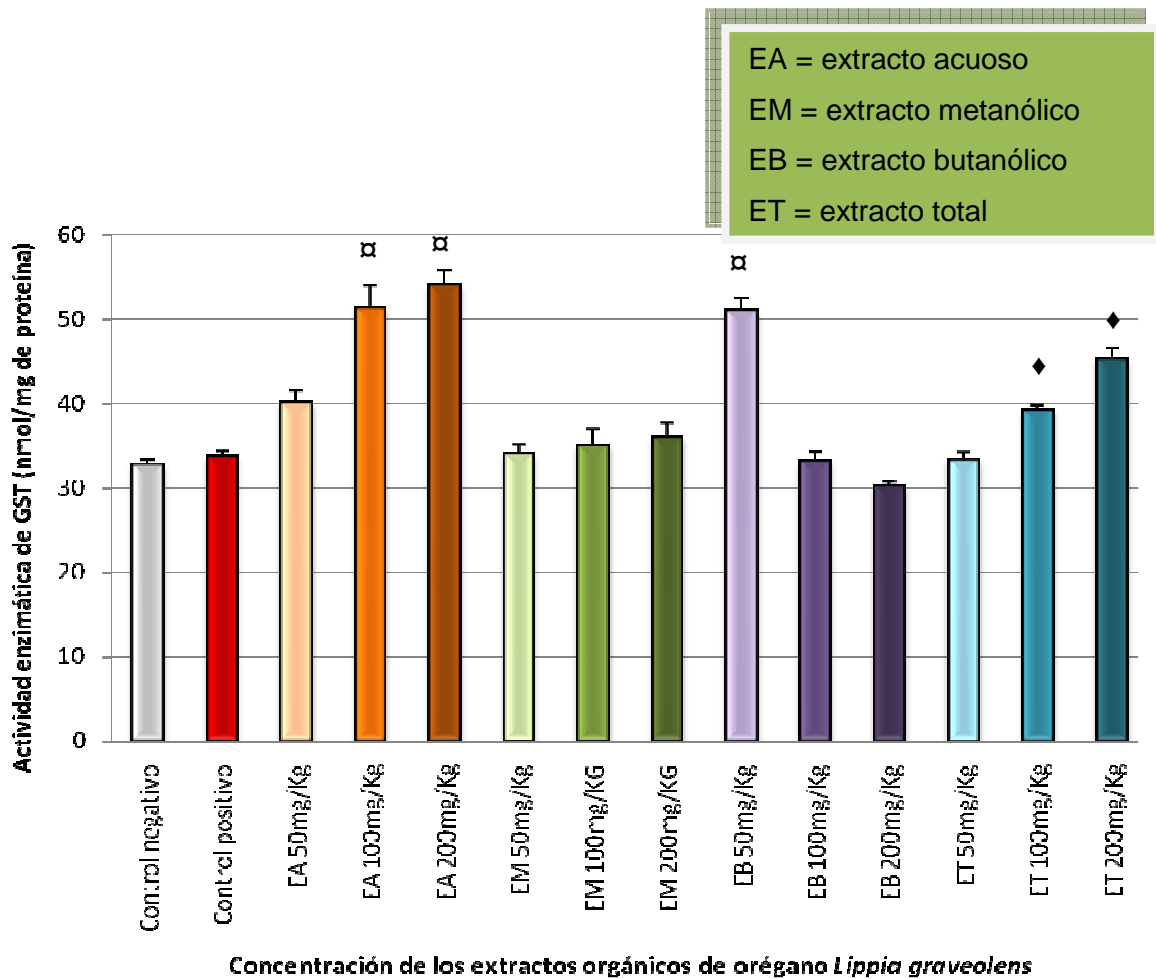


Figura 13. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon distal después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

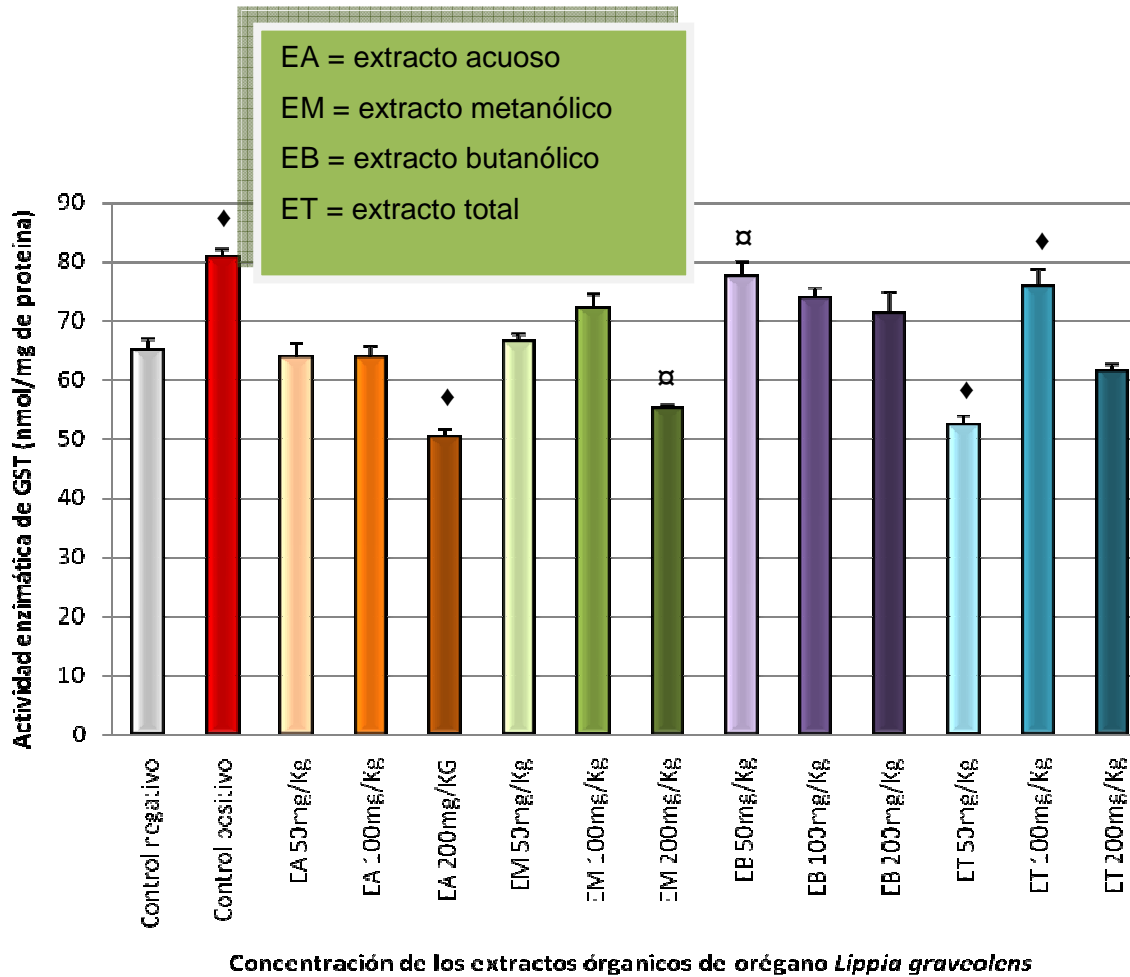


Figura 14. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en colon proximal después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Los resultados de la actividad enzimática de GST en colon distal y proximal se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Actividad enzimática de GST [nmol/(mg de proteína)(min)]						
	Hígado	Riñón	Pulmón	Intestino	Colon distal	Colon proximal
Control Negativo	866.732 ± 81.446	290.216 ± 13.389	4.591 ± 0.499	80.081 ± 9.155	32.642 ± 2.225	64.957 ± 5.176
Control Positivo	919.961 ± 77.536	342.626 ± 33.801	8.101 ± 0.711	90.280 ± 6.400	33.741 ± 1.886	80.569 ± 3.641
Extracto Acuoso						
50 mg/Kg	718.854 ± 61.920 ♦	344.238 ± 42.366 ▫	5.102 ± 0.269	95.321 ± 9.075 ♦	40.024 ± 4.936	63.657 ± 7.077
100 mg/Kg	838.007 ± 66.512 ♦	332.650 ± 30.627 ▫	6.219 ± 0.941 ▫	86.386 ± 6.382	51.278 ± 8.822 ▫	63.625 ± 5.959
200 mg/Kg	856.990 ± 82.957	305.181 ± 29.524	9.048 ± 0.264 ▫	103.568 ± 9.840 ♦	54.001 ± 5.307 ▫	50.185 ± 4.052 ♦
Extracto Metanólico						
50 mg/Kg	876.811 ± 66.265	342.823 ± 22.190 ▫	6.990 ± 0.545 ♦	100.004 ± 10.610 ♦	34.015 ± 3.761	66.436 ± 3.821
100 mg/Kg	788.702 ± 66.655 ♦	315.492 ± 32.355	8.453 ± 0.449 ♦	118.304 ± 10.909 ♦	35.011 ± 4.373	72.102 ± 6.442
200 mg/Kg	962.842 ± 92.382	355.314 ± 30.011 ▫	5.556 ± 1.021	121.378 ± 8.874 ♦	36.006 ± 4.984	55.102 ± 1.312 ▫
Extracto Butanólico						
50 mg/Kg	755.572 ± 64.569 ♦	327.429 ± 34.451 ▫	4.774 ± 0.749	103.418 ± 4.143 ♦	50.942 ± 4.891 ▫	77.443 ± 8.021 ▫
100 mg/Kg	916.741 ± 89.225	302.512 ± 46.571	7.711 ± 0.944 ♦	104.876 ± 3.324 ♦	33.070 ± 3.736	73.793 ± 4.799
200 mg/Kg	896.031 ± 63.885	312.672 ± 24.434	5.886 ± 0.402 ♦	102.174 ± 8.636 ♦	30.106 ± 1.693	71.078 ± 10.307
Extracto Total						
50 mg/Kg	994.218 ± 101.668	318.076 ± 38.971	8.726 ± 0.739 ▫	84.854 ± 7.713	33.254 ± 2.909	52.331 ± 4.966 ♦
100 mg/Kg	1084.479 ± 102.590 ♦	304.985 ± 22.177	8.558 ± 0.475 ▫	106.122 ± 7.041 ♦	39.214 ± 3.733 ♦	75.745 ± 8.040 ♦
200 mg/Kg	773.359 ± 71.026 ♦	331.331 ± 39,912 ▫	8.390 ± 0.210	96.311 ± 8.610 ♦	45.174 ± 4.566 ♦	61.459 ± 2.926

Los valores representan la media ± EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

▫ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn (P < 0.05).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett (P < 0.05).

VI.3 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos acuoso, butanólico, metanólico y total de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

La glutatión peroxidasa (GPX), la peroxidasa principal en los mamíferos presente en cantidades significativas en el citoplasma, cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O a través de la oxidación de GSH dando como resultado glutatión oxidado (GSSG). Además, la GPX cataliza la degradación de los peróxidos lipídicos (LPO) y puede metabolizar los hidroperóxidos lipídicos a ácidos grasos hidroxilados menos reactivos (Al-Gubory y col., 2004), ejerciendo así un efecto protector antioxidante.

VI.3.1 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en hígado por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Los niveles de la actividad de GPx en hígado mostraron un incremento favorable y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 15, observándose la mayor inducción significativa con el extracto acuoso (181.5 – 244.6%) de forma dosis – dependiente, seguida del extracto metanólico (95 – 122.9%, $P < 0.05$). También los extractos butanólico y total incrementaron significativamente la actividad de GPx en 41.3 – 134.6% y 81.6 – 139.9%, respectivamente, a las tres dosis. De forma similar, el timol (200 mg/Kg) incrementó más del doble la actividad enzimática (257.9%, $P < 0.05$) en comparación que el control negativo.

VI.3.2 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en riñón por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

El riñón, al igual que el hígado, contiene un complejo sistema enzimático que ayuda a la biotransformación y/o expulsión de los diversos compuestos xenobióticos y radicales libres causantes de daños celulares que puede expresarse en enfermedades crónicas degenerativas. Sin embargo, la actividad de GPx se

incrementó de manera significativa únicamente con el extracto butanólico a las dosis de 100 y 200 mg/Kg en un 19.7 y 19.8%, respectivamente; mientras que, timol a 200 mg/Kg indujo la actividad en un 19.8%, en comparación con el control negativo.

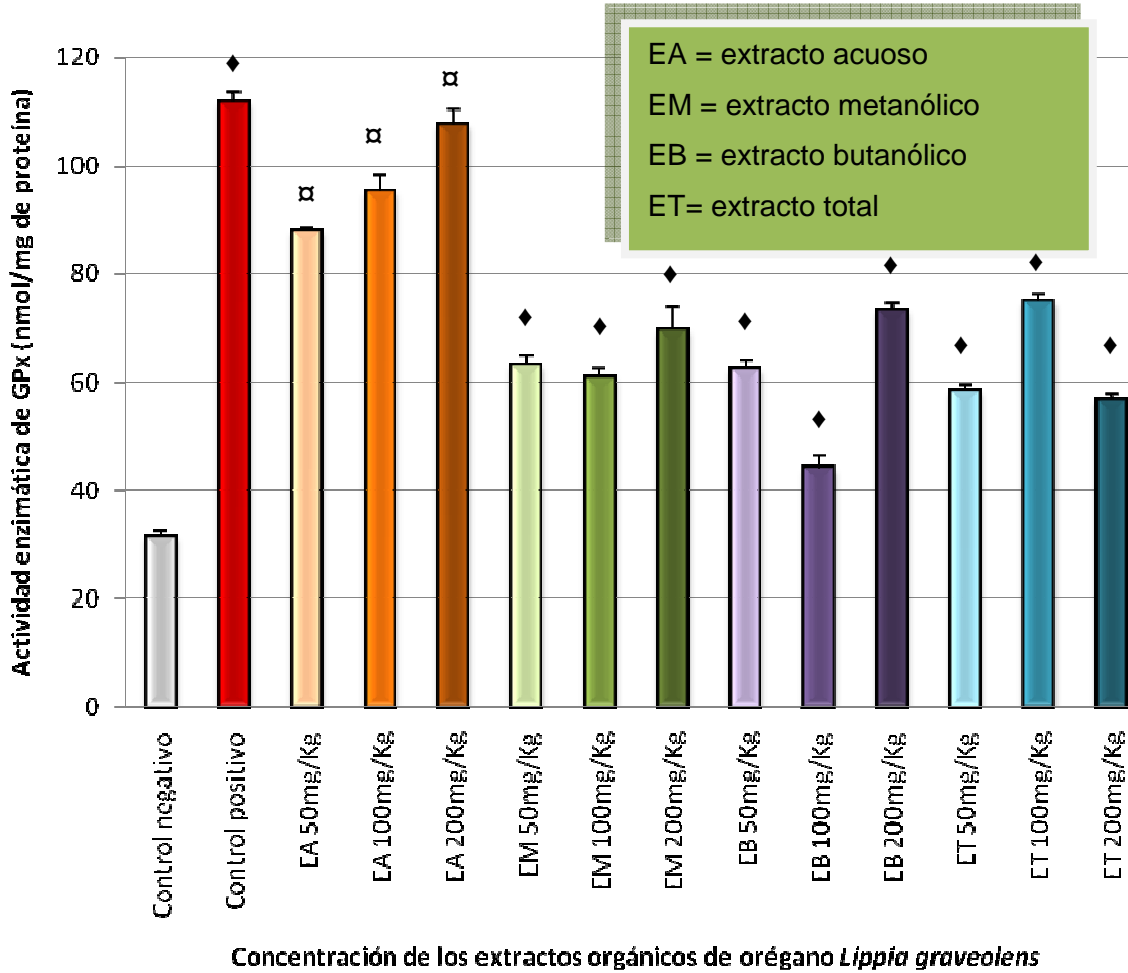


Figura 15. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en hígado después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media ± EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

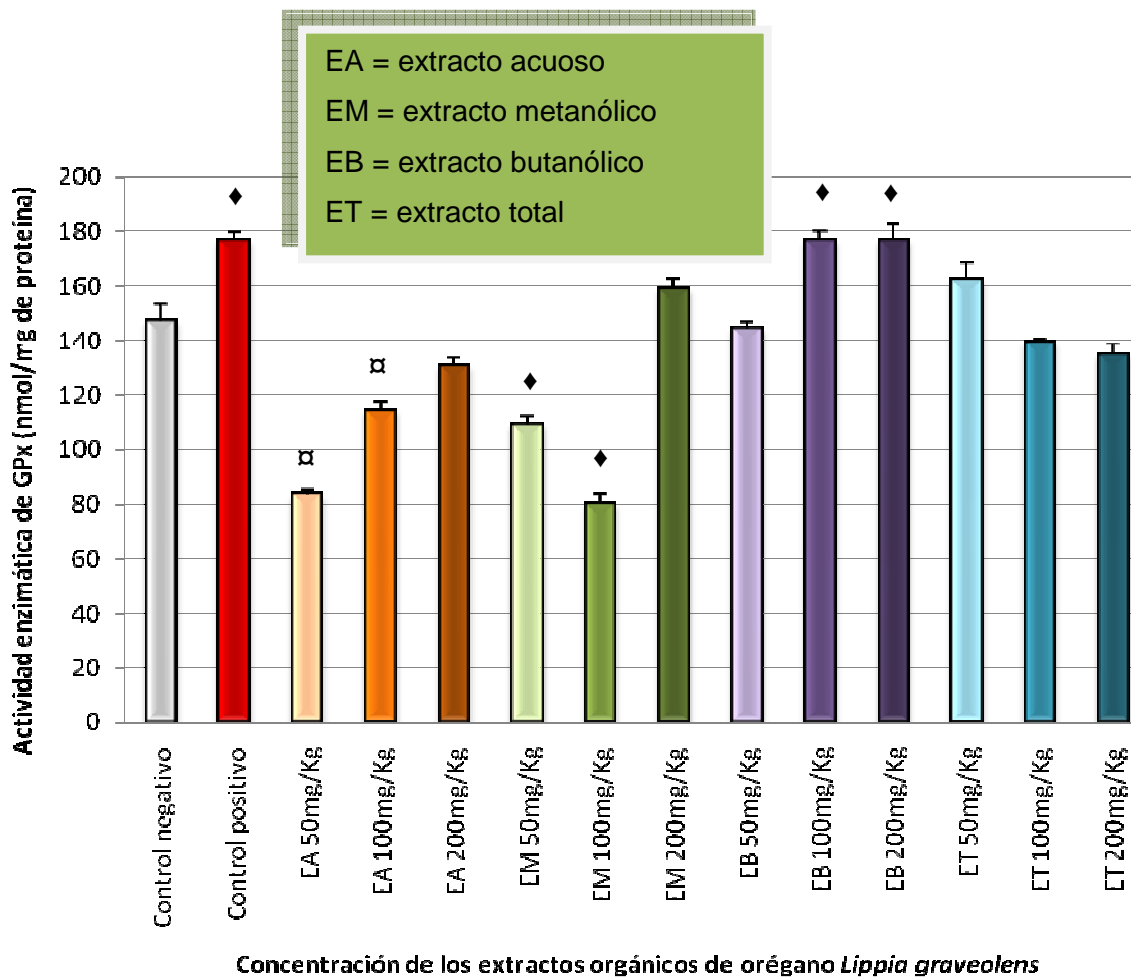


Figura 16. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en riñón después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Los resultados de la actividad enzimática de GPx en hígado y riñón se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 7.

VI.3.3 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en pulmón por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Durante la realización de esta tesis uno de los principales órganos de interés fue el pulmón ya que no hay suficiente estudios sobre los niveles de inducción enzimática en este órgano. En la Figura 17 se muestran los resultados para la actividad de GPx en pulmón por efecto del tratamiento con los extractos de orégano *Lippia graveolens*. En general, se observa una inducción de la actividad de GPx, siendo estadísticamente mayor a la dosis de 100 mg/Kg del extracto acuoso (141.3%), dosis – dependiente con el extracto metanólico (18.8 – 97.1%), a las dosis de 50 y 100 mg/Kg del extracto butanólico (95.8 y 63.6%, respectivamente) y del 37.2 – 83.7% con el extracto total. El control positivo presento niveles de inducción de un 30.6% en comparación con el control negativo.

VI.3.4 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en intestino delgado por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

En el intestino pueden encontrarse factores que interfieren o impiden las funciones enzimáticas capaces de ayudar al sistema biológico en la biotransformación y expulsión de radicales libres y xenobióticos, causando un desequilibrio en células sanas y propiciando la generación de enfermedades crónico-degenerativas. Como se observa en la Figura 18, en este estudio los diversos extractos de orégano *Lippia graveolens* inhibieron significativamente la actividad de GPx en este órgano. Por lo anterior, estos resultados debieran considerarse como un efecto adverso en intestino delgado; siendo el timol (200 mg/Kg) el único que incrementó la actividad en un 58.1% más en comparación al control negativo.

Los resultados de la actividad enzimática de GPx en pulmón e intestino delgado se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 7.

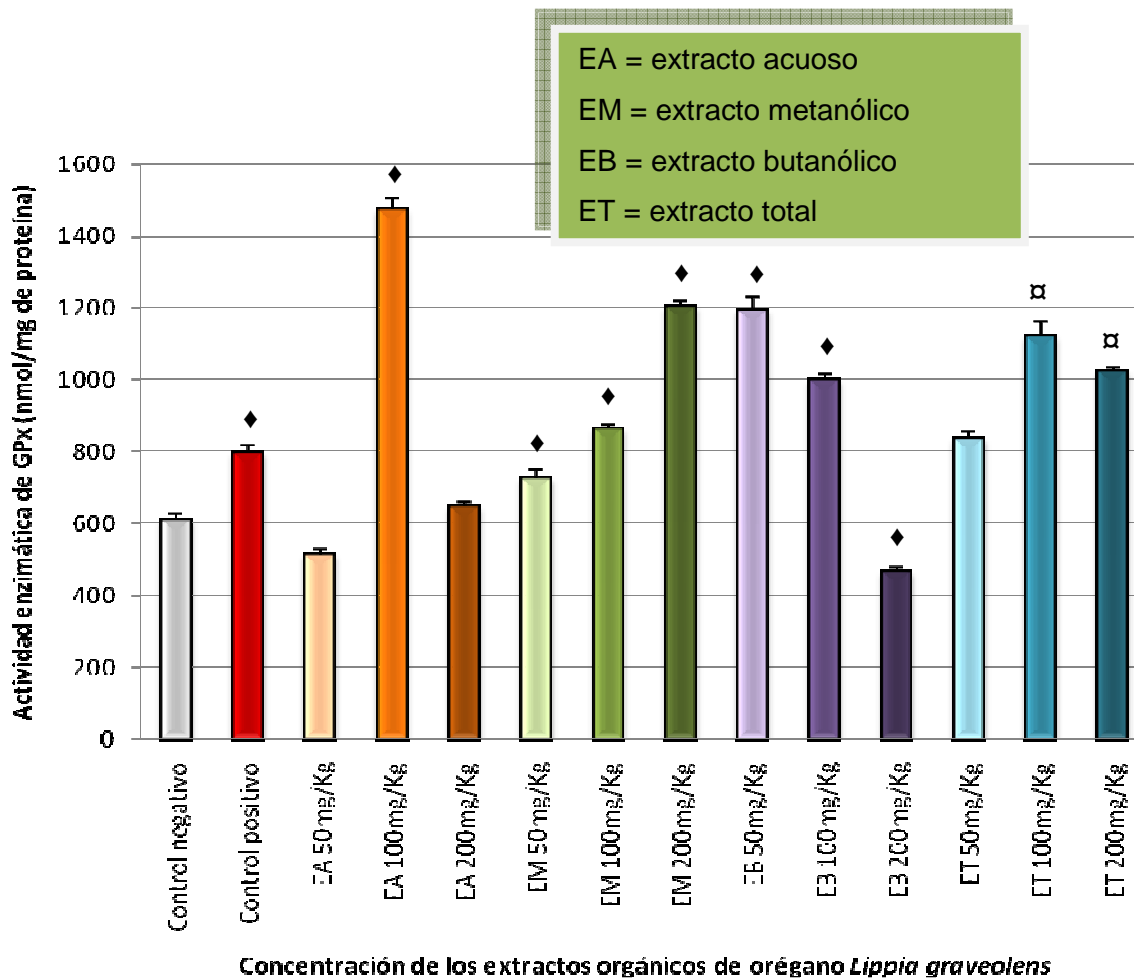


Figura 17. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en pulmón después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

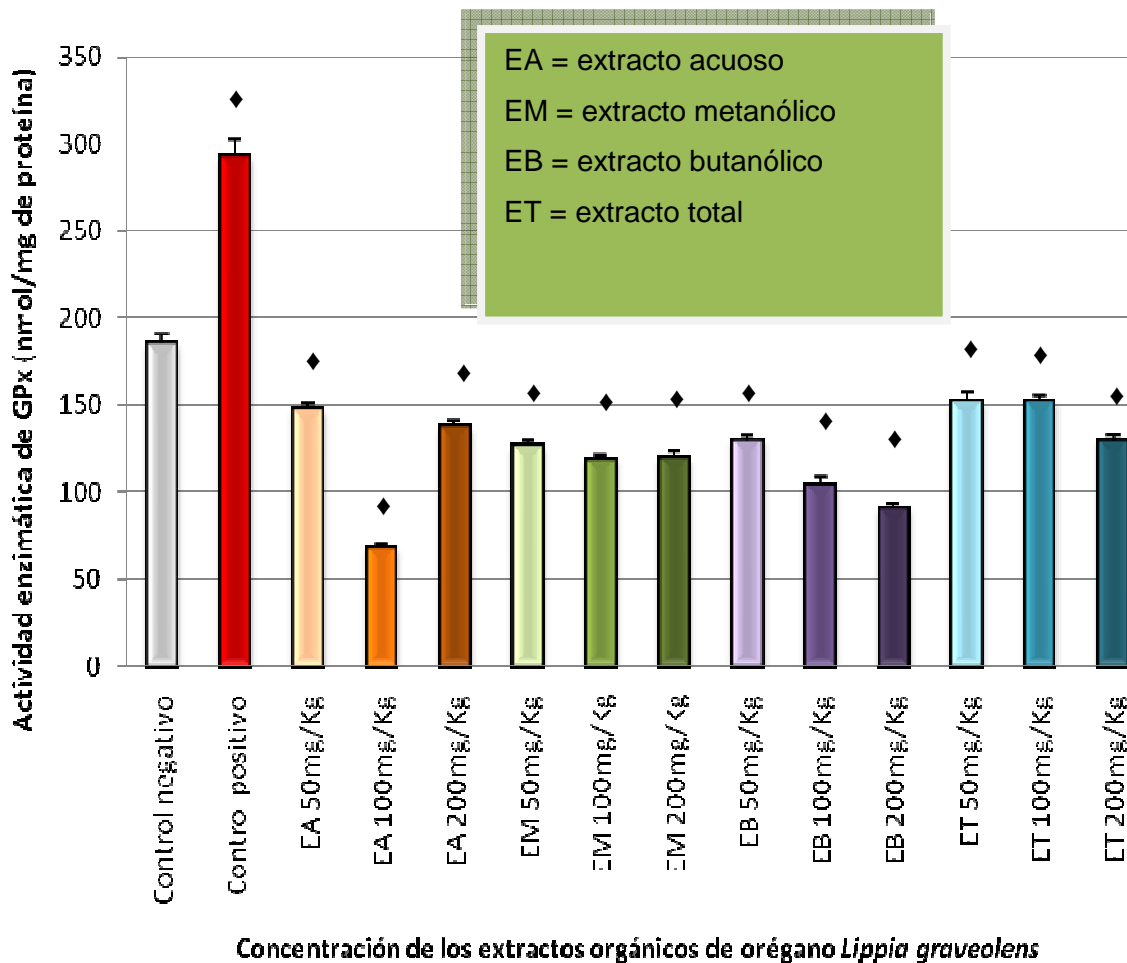


Figura 18. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en intestino delgado después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

VI.3.5 Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en colon distal y proximal por efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos para el colon distal, donde los extractos acuoso (114.6 – 194.9%) y total (22 – 50.7%) incrementaron significativamente la actividad enzimática de GPx de manera dosis – dependiente, comparada con la del control negativo (122.2 nmol/mg*min). Para el extracto metanólico, la inducción de GPx se obtuvo a las dosis de 50 y 100 mg/Kg (195.3 y 223.5%, respectivamente) y para el extracto butanólico, la actividad de GPx fue 107.4, 79 y 132.6% mayor a la del control negativo a dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg, respectivamente. Mientras que el timol a 200 mg/Kg, utilizado como control positivo, presentó un nivel de inducción de 34.3% mayor al control negativo.

Los resultados obtenidos para el colon proximal se muestran en la Figura 20, donde se observa un incremento significativo en la actividad de GPx con el extracto metanólico a las dosis de 100 y 200 mg/Kg (32.3 y 42.5%, respectivamente), con el extracto butanólico a las dosis de 50 y 100 mg/Kg (35.6 y 31.7%, respectivamente) y con el extracto total a la dosis de 200 mg/Kg (12.2%), comparados con el control negativo (95.3 nmol/mg*min). Por el contrario, el extracto acuoso no tuvo un efecto inductor en la actividad de GPx en el colon proximal. Mientras que, el timol a 200 mg/Kg presentó una inducción del 49.2% en la actividad enzimática, mayor a la del control negativo.

Los resultados de la actividad enzimática de GPx en colon distal y proximal se muestran como la media \pm EE y los valores se presentan en el Cuadro 7.

VI.4 Efecto biológico de la administración intragástrica de diferentes extractos de orégano mexicano sobre los niveles de glucosa y perfil de lípidos en el suero de ratas Sprague-Dawley.

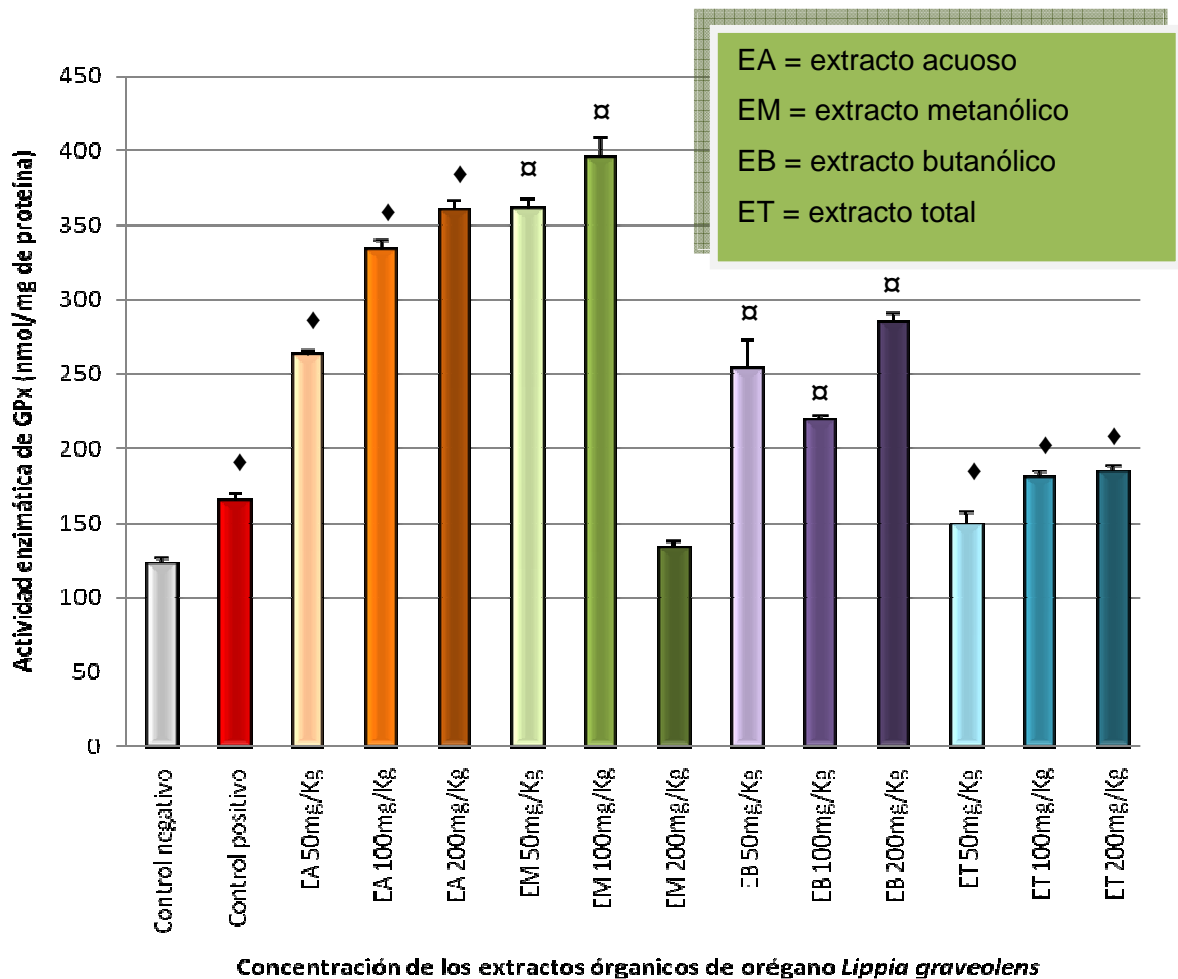


Figura 19. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en colon distal después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

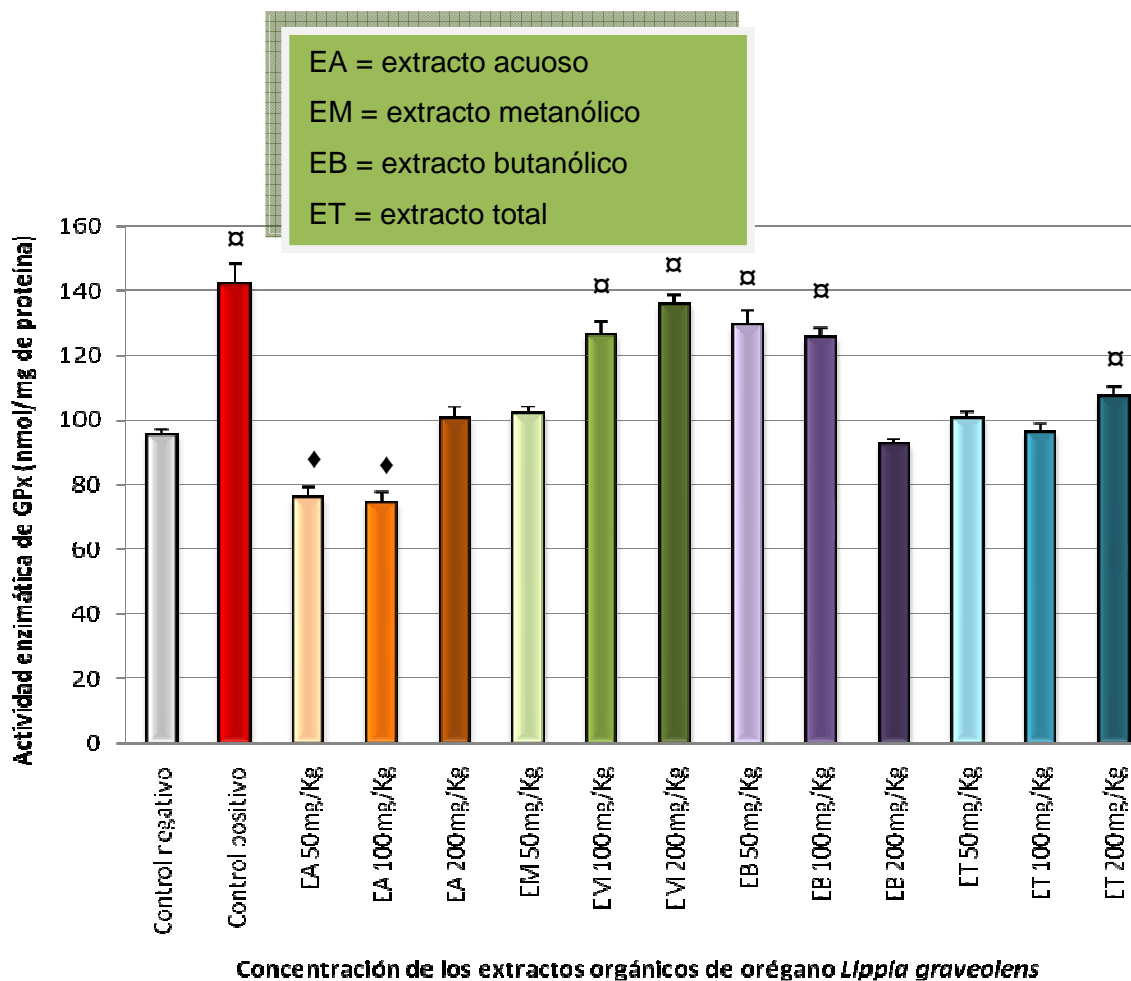


Figura 20. Efecto de los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* sobre la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en colon proximal después de dos semanas de tratamiento.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Actividad enzimática de glutatión peroxidasa (GPx) en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Actividad enzimática de GPx [nmol/(mg de proteína)(min)]						
	Hígado	Riñón	Pulmón	Intestino	Colon distal	Colon proximal
Control Negativo	31.234 ± 3.392	147.463 ± 11.788	610.087 ± 24.39	185.504 ± 12.937	122.151 ± 12.200	95.273 ± 4.662
Control Positivo	111.801 ± 4.713 ♦	176.707 ± 7.093 ♦	796.836 ± 57.43 ♦	293.196 ± 21.689 ♦	164.054 ± 15.729 ♦	142.130 ± 11.66 □
Extracto Acuoso						
50 mg/Kg	87.932 ± 1.515	83.518 ± 4.303 □	512.334 ± 42.40	147.371 ± 8.392 ♦	262.136 ± 9.847 ♦	75.959 ± 8.431 ♦
100 mg/Kg	95.209 ± 7.968 □	114.063 ± 7.751 □	1472.150 ± 85.0	68.430 ± 5.382 ♦	333.115 ± 17.278 ♦	74.340 ± 7.801 ♦
200 mg/Kg	107.646 ± 7.240 □	130.487 ± 8.016	645.302 ± 39.17	137.410 ± 10.324 ♦	360.200 ± 15.720 ♦	100.400 ± 8.433
Extracto Metanólico						
50 mg/Kg	62.937 ± 5.409 ♦	108.987 ± 7.508 ♦	724.549 ± 64.93 ♦	126.373 ± 8.868 ♦	360.665 ± 18.059 □	101.740 ± 5.559
100 mg/Kg	60.913 ± 4.069 ♦	79.855 ± 9.345 ♦	861.719 ± 34.09 ♦	118.943 ± 5.682 ♦	395.174 ± 33.917 □	126.030 ± 10.41 □
200 mg/Kg	69.627 ± 11.002 ♦	158.737 ± 7.217	1202.32 ± 40.96 ♦	119.159 ± 11.166 ♦	132.755 ± 10.547	135.790 ± 7.150 □
Extracto Butanólico						
50 mg/Kg	62.198 ± 4.597 ♦	144.656 ± 3.756	1194.38 ± 88.08 ♦	129.252 ± 7.851 ♦	253.331 ± 32.079 □	129.190 ± 10.41 □
100 mg/Kg	44.124 ± 6.138 ♦	176.529 ± 6.429 ♦	998.106 ± 42.45 ♦	104.122 ± 11.369 ♦	218.642 ± 8.150	125.480 ± 7.899 □
200 mg/Kg	73.282 ± 3.831 ♦	176.640 ± 9.815 ♦	466.009 ± 31.20 ♦	90.104 ± 9.222 ♦	284.152 ± 15.363 □	92.356 ± 4.223
Extracto Total						
50 mg/Kg	58.440 ± 3.051 ♦	162.048 ± 15.180	836.921 ± 48.15	152.050 ± 14.090 ♦	149.063 ± 18.042 ♦	100.420 ± 4.626
100 mg/Kg	74.934 ± 3.355 ♦	139.230 ± 2.946	1120.58 ± 87.22 □	152.212 ± 8.607 ♦	180.080 ± 11.119 ♦	96.184 ± 6.625
200 mg/Kg	56.726 ± 2.899 ♦	134.728 ± 9.289	1022.526 ± 29.91 □	129.364 ± 8.810 ♦	184.092 ± 11.476 ♦	106.910 ± 7.687 □

Los valores representan la media ± EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

□ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn (P < 0.05).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett (P < 0.05).

El perfil lipídico mide lo siguiente:

- El colesterol total, que es la suma de los diferentes tipos de colesterol.
- Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que suelen recibir el nombre de colesterol "bueno". Las lipoproteínas pueden considerarse el sistema de transporte de la sangre, así las lipoproteínas de alta densidad transportan colesterol al hígado para su eliminación.
- Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), generalmente conocidas como colesterol "malo". Las lipoproteínas LDL que se acumulan en el torrente sanguíneo pueden tapar los vasos sanguíneos e incrementar el riesgo de afecciones cardíacas.
- Los triglicéridos, que almacenan energía hasta que el organismo la necesita. Si el cuerpo acumula demasiados triglicéridos, los vasos sanguíneos se pueden tapar y provocar problemas de salud

VI.4.1 Colesterol

El colesterol es un precursor facultativo de las hormonas corticoadrenales, ováricas y esteroides testiculares. La mayor parte del colesterol en el plasma procede del hígado y su concentración igualmente es resultado del equilibrio entre la síntesis y catabolismo que tiene lugar en este órgano. En esta investigación se determinó el colesterol en plasma sanguíneo que se extrajo por medio de punción cardíaca durante el sacrificio de los animales después de dos semanas de experimentación.

En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos donde se aprecia que el extracto acuoso redujo los niveles de colesterol en un 28.2, 23.1 y 21.1% para las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg en comparación al control negativo (113.05 ± 6.55 mg/dL), respectivamente; mientras que el extracto metanólico a la dosis de 50 y 100 mg/Kg redujo el colesterol en un 10.6% y 3.15%, respectivamente; sin embargo, la dosis de 200 mg/Kg elevó los niveles de colesterol en un 14.1% en comparación del control negativo; lo cual no se observa con los otros extractos.

Para el extracto butanólico, los niveles de colesterol se redujeron en un 12.5, 14 y 2.4% a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg, respectivamente; el extracto total redujo los niveles de colesterol en un 17.7%, 4.63% y 2.9% a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con timol a 200 mg/Kg incrementó los niveles de colesterol en un 5.5%, comparados con el control negativo. Estos resultados demuestran que los diversos extractos de orégano administrados a los sujetos experimentales redujeron favorablemente los niveles de colesterol (2.4 – 28.2%), excepto para el extracto metanólico a la dosis de 200 mg/Kg y timol.

VI.4.2 Colesterol HDL

Las lipoproteínas son las encargadas de transportar en la sangre el colesterol, triglicéridos y otras grasas insolubles. Las HDL son portadoras de colesterol y ejercen un efecto protector, impidiendo la captación celular de colesterol y lípidos. Estas posibles acciones podrían ser el origen de las características protectoras cardiovasculares asociadas con el HDL dentro de la sangre. Por lo anterior, otro parámetro para este estudio fue la determinación del colesterol HDL y los resultados se muestran Figura 22. Se puede observar que los extractos acuoso a la dosis de 100 mg/Kg, metanólico a la dosis de 50 mg/Kg, butanólico a la dosis de 50 mg/Kg y total a la dosis de 100 mg/Kg, elevaron significativamente la concentración de colesterol HDL en un 14.7, 9.7, 19.6 y 25.8% por encima del control negativo (50.783 ± 1.541 mg/dL), respectivamente. Mientras que, el timol a dosis de 200 mg/Kg incrementó el contenido en un 14.7% más que el control negativo. En general, se observa un resultado alentador en el aumento de los niveles del colesterol HDL por la administración de los extractos de orégano.

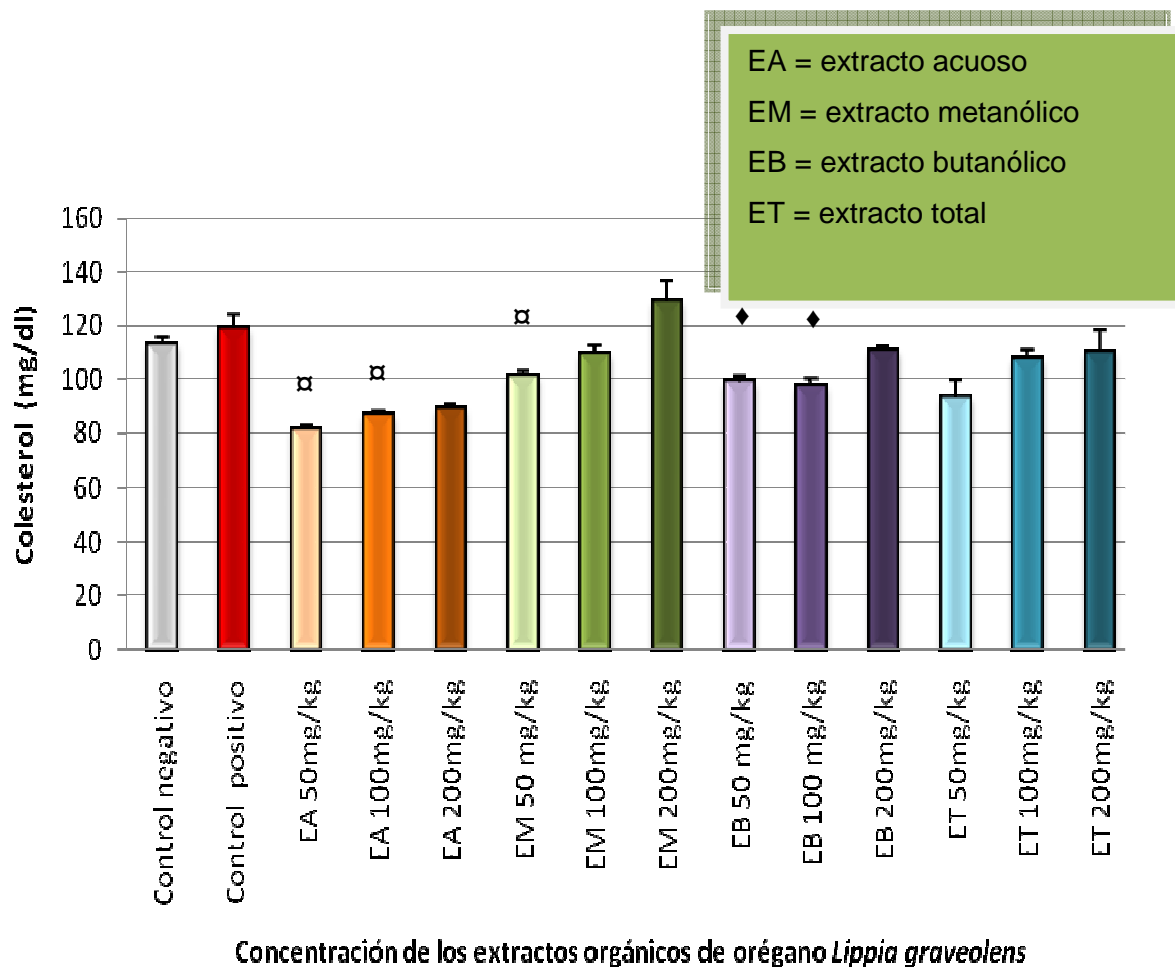
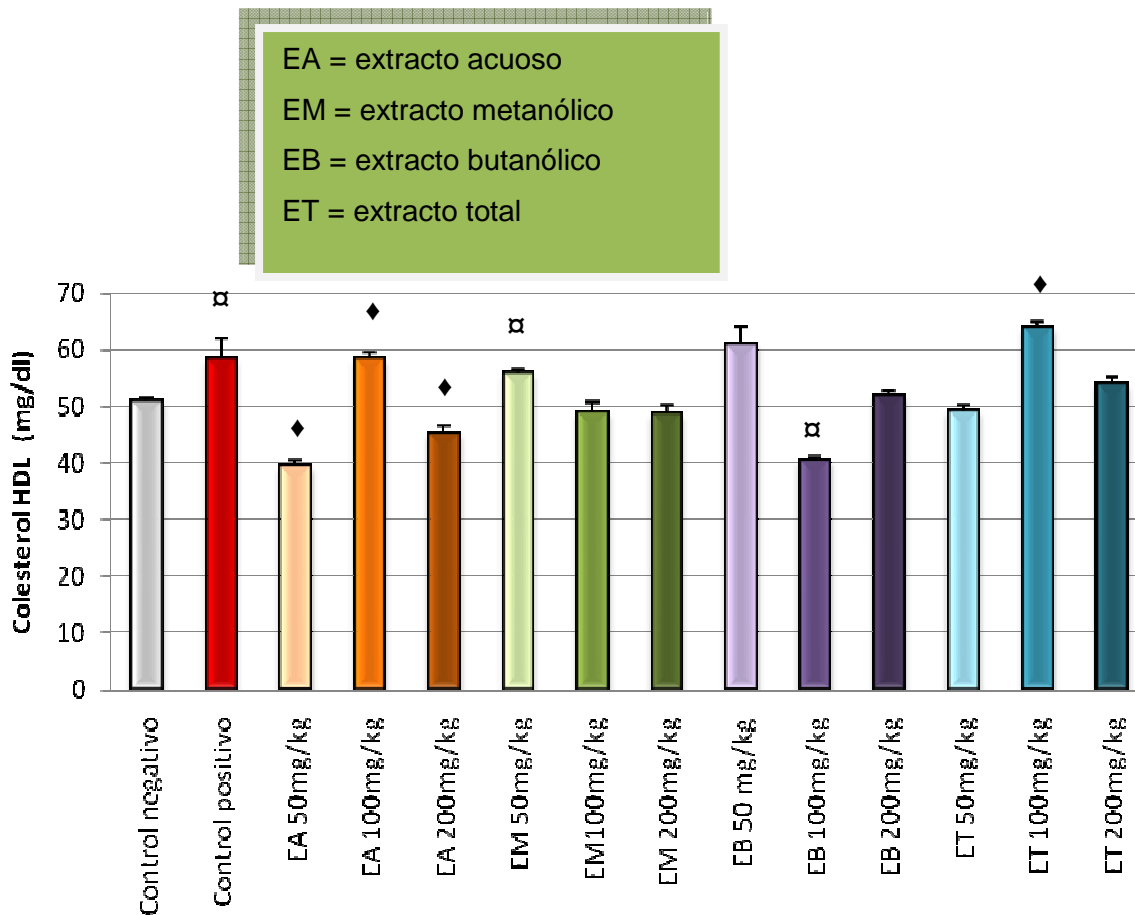


Figura 21. Niveles de colesterol en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Los valores representan la media ± EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).



Concentración de los extractos orgánicos de orégano *Lippia graveolens*

Figura 22. Niveles de colesterol HDL en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

En el Cuadro 8 se presenta la concentración de colesterol y HDL en sangre por efecto de los extractos y los valores se expresan como las medias \pm EE.

VI.4.3 Triglicéridos

Los triglicéridos son el principal tipo de grasa transportado por el organismo y reciben el nombre de su estructura química. Luego de comer, el organismo digiere las grasas de los alimentos y libera triglicéridos a la sangre. Posteriormente, estos son transportados a todo el organismo para dar energía o para ser almacenados como grasa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23 donde se puede apreciar que, inesperadamente, el extracto acuso a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg incrementó las concentraciones de triglicéridos en un 142.6, 70.1 y 69.7%, respectivamente, comparadas con el control negativo (59.41 ± 6.14 mg/dL). Similarmente, los extractos metanólico (16.5 – 41.5%) y butanólico (47.5 – 70.1%, $P < 0.05$) incrementaron las concentraciones de triglicéridos de manera dosis – dependiente, comparadas con las del control negativo. Para el extracto total, la concentración de triglicéridos a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg fueron 22.6, 15.3 y 21.2% mayor a la del control negativo. Por el contrario, el tratamiento con timol a 200 mg/Kg redujo los niveles de triglicéridos en un 9.5% en comparación al control negativo.

En el Cuadro 8 se presenta la concentración de triglicéridos en sangre por efecto de los extracto de los diversos grupos de experimentación y los valores se expresan como las medias \pm EE.

VI.4 Glucosa

La glucosa es la principal fuente de energía para el metabolismo celular. Se obtiene fundamentalmente a través de la alimentación y se almacena principalmente en el hígado, el cual tiene un papel primordial en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre (glucemia).

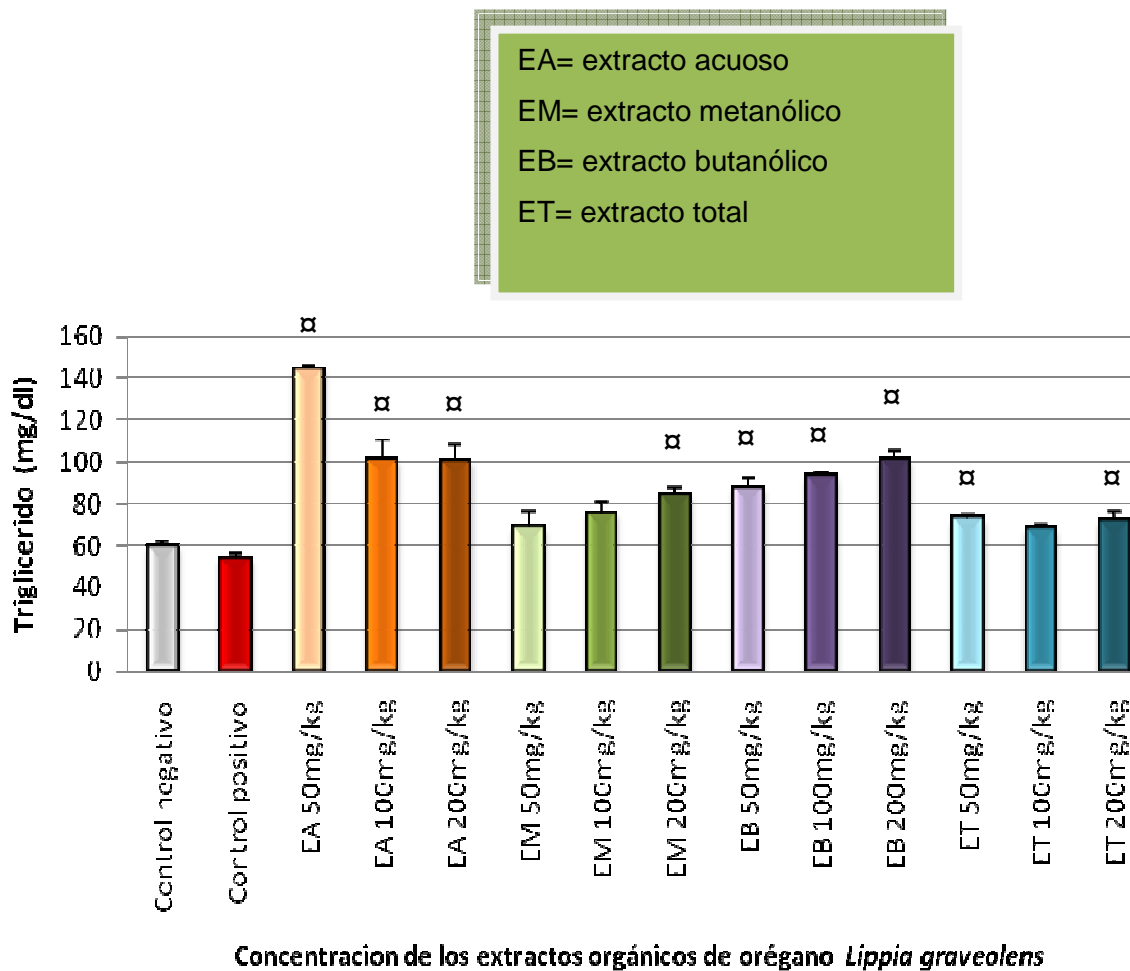


Figura 23. Niveles de triglicéridos en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

Para que esos niveles se mantengan y el almacenamiento en el hígado sea adecuado, se precisa la ayuda de la insulina, sustancia producida por el páncreas. Cuando la insulina es insuficiente, la glucosa se acumula en sangre, y si esta situación se mantiene, da lugar a una serie de complicaciones en distintos órganos. Esta es la razón principal por la que se produce aumento de glucosa en sangre, pero hay otras enfermedades y alteraciones que también la provocan. Como parte de la evaluación del perfil plasmático de cada grupo experimental, en la Figura 24 se muestran los niveles de glucosa obtenidos después de dos semanas de tratamiento con cada extracto. Contrario a lo esperado, la concentración de glucosa fue mayor para los extractos acuoso (48.3, 45.1 y 25.7%), metanólico (36.3, 27.2 y 36.4%) y butanólico (72.3, 70.58 y 57.5%) a las dosis de 50, 100 y 200 mg/Kg, respectivamente, comparada con la del control negativo (99.08 ± 9.91 mg/dL). Para el extracto total, la concentración de glucosa se incrementó de manera dosis – dependiente (30.7, 50 y 57.9%). En esta sección del estudio biológico se observó un aumento considerable de los niveles de glucosa en los grupos experimentales respecto al control negativo. El tratamiento con timol a dosis de 200 mg/Kg redujo ligeramente los niveles de glucosa en un 1.8%, en comparación con el control negativo.

En el Cuadro 8 se observan las medias \pm EE de las respuestas por extracto de los diversos grupos de experimentación.

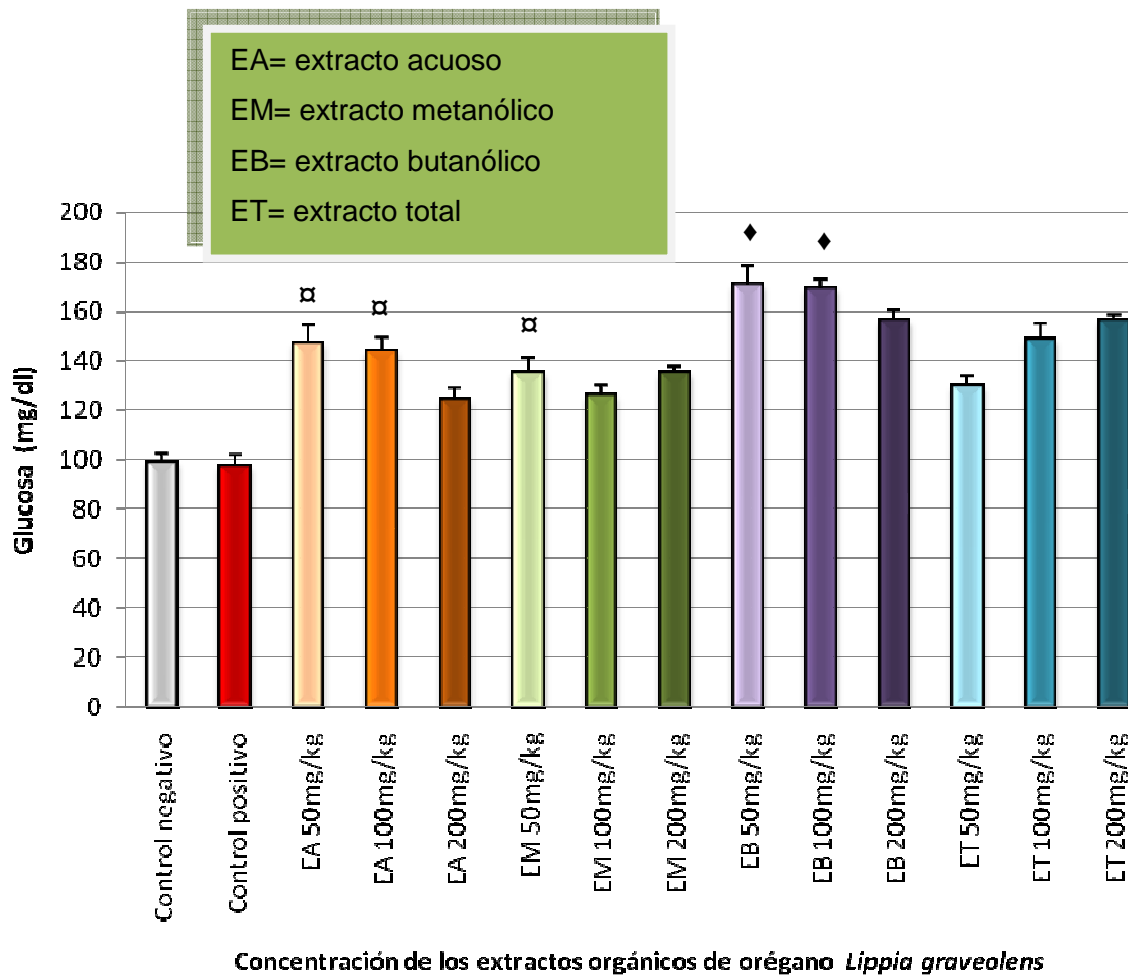


Figura 24. Niveles de glucosa en plasma después de dos semanas de tratamiento con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Los valores representan la media \pm EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

α Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

♦ Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

Cuadro 8. Análisis de perfil lipídico y glucosa en ratas Sprague-Dawley tratadas con los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*.

Grupo	Concentración en plasma (mg/dL)			
	Colesterol	Colesterol HDL	Triglicéridos	Glucosa
Control Negativo	113.045 ± 6.550	50.783 ± 1.541 \square	59.411 ± 6.139	99.082 ± 9.910
Control Positivo	119.207 ± 13.382	58.224 ± 10.561	53.746 ± 6.030	97.261 ± 13.031
Extracto Acuoso				
50 mg/Kg	81.128 ± 3.470 \square	39.360 ± 3.015 \blacklozenge	144.141 ± 4.647 \square	146.957 ± 22.059 \square
100 mg/Kg	86.961 ± 2.536 \square	58.257 ± 3.209 \blacklozenge	101.066 ± 27.143 \square	143.733 ± 15.595 \square
200 mg/Kg	89.193 ± 3.363	45.032 ± 3.766 \blacklozenge	100.812 ± 20.498 \square	124.498 ± 12.368
Extracto Metanólico				
50 mg/Kg	101.066 ± 4.820 \square	55.728 ± 1.642 \square	69.203 ± 21.147	134.978 ± 16.610 \square
100 mg/Kg	109.481 ± 8.233	48.963 ± 4.556	75.613 ± 14.278	126.062 ± 11.303
200 mg/Kg	129.004 ± 21.763	48.680 ± 4.411	84.069 ± 9.757 \square	135.175 ± 6.576
Extracto Butanólico				
50 mg/Kg	98.960 ± 5.557 \blacklozenge	60.761 ± 9.034	87.638 ± 13.135 \square	170.702 ± 21.260 \blacklozenge
100 mg/Kg	97.243 ± 7.465 \blacklozenge	40.344 ± 1.407 \square	93.033 ± 3.360 \square	169.266 ± 10.297 \blacklozenge
200 mg/Kg	110.332 ± 5.119	51.801 ± 2.714	101.066 ± 11.129 \square	156.006 ± 11.987
Extracto Total				
50 mg/Kg	93.016 ± 18.661	49.102 ± 2.949	72.856 ± 4.626 \square	129.538 ± 11.625
100 mg/Kg	107.812 ± 7.632	63.895 ± 3.002 \blacklozenge	68.510 ± 2.627 \square	148.663 ± 17.485
200 mg/Kg	109.727 ± 23.376	53.925 ± 3.398	72.028 ± 12.757 \square	156.459 ± 5.962

Los valores representan la media ± EE. Control positivo: Timol (200 mg/Kg).

\square Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunn ($P < 0.05$).

\blacklozenge Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo de acuerdo a la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN

Los polifenoles son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas, hierbas y en bebidas como vino y cerveza. En un principio, estos compuestos fueron considerados sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana; más tarde se demostraron sus múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos polifenoles poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Hernández y Prieto, 1999).

El efecto protector de estos compuestos naturales también está asociado a su capacidad para modular la expresión de genes y la activación de enzimas involucradas en el metabolismo y detoxificación de sustancias dañinas al organismo, como las enzimas GST y NQO1, proporcionando con ello protección contra los mecanismos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos de sustancias presentes en la dieta y en el medio ambiente, así como la activación de enzimas antioxidantes como la GPx, SOD y CAT, en los diferentes tejidos u órganos (Munday y col., 2005). De esta forma, las ERO generadas durante las funciones celulares normales son eficientemente removidas o eliminadas por estos mecanismos antioxidantes enzimáticos (GST, GPX y CAT) o no-enzimáticos (glutatión reducido, GSH). Sin embargo, estos sistemas de defensa se encuentran generalmente disminuidos o alterados en las personas con enfermedades crónico degenerativas (Marini y col., 2006). Por lo tanto, los polifenoles presentes naturalmente en las plantas comestibles con capacidad de inducir estos sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos se consideran generalmente benéficos, ya que contribuyen a

disminuir o controlar los efectos negativos del estrés oxidativo o de las sustancias tóxicas presentes en la dieta o en el ambiente.

En la Figura 25 se muestra esquemáticamente la cooperatividad entre los diversos sistemas enzimáticos. La conjugación con GSH por la enzima GST es con frecuencia un proceso muy importante en la detoxificación de diferentes compuestos y EROs. Debido al amplio rango de sustratos que se pueden conjugar a través de esta vía, el mecanismo de formación de conjugados puede variar un poco y excretarse en la orina como derivados del ácido mercaptúrico o por la bilis como conjugados del propio glutatión o de cistetil-glicina.

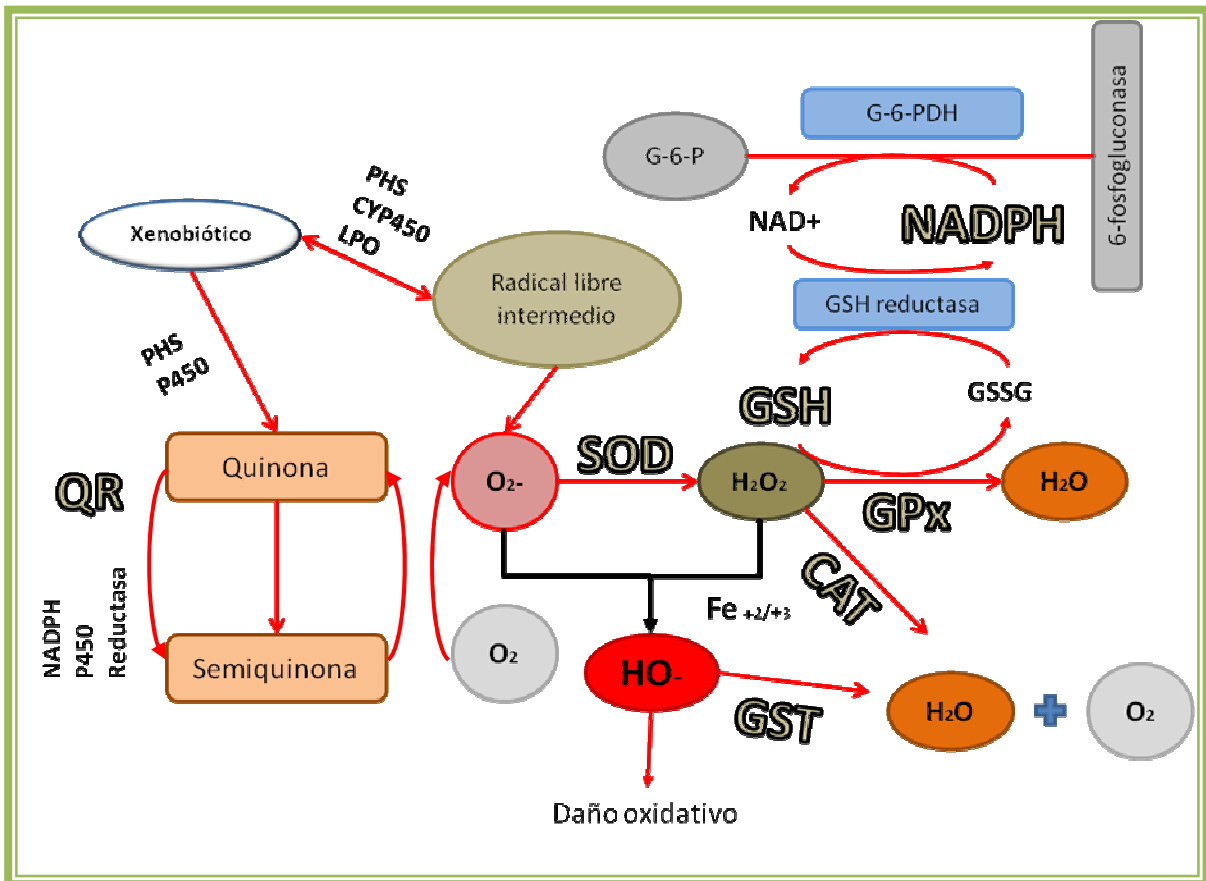


Figura 25. Cooperatividad entre los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

La GPx es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del H₂O₂ o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el GSH. Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y que dan lugar a EROs como los radicales peróxido (L-OO*), que son compuestos indeseables para los organismos vivos. La GPx, como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH, reduciéndolos en presencia de GSH. Posteriormente, el glutatión oxidado (GSSG) es reducido por la glutatión reductasa (GRd) que utiliza NADPH (proveniente de la vía pentosa fosfato) como dador de electrones, manteniendo así la proporción GSH/GSSG. De esta forma, la GPx y GRd se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd). Similarmente, las enzimas catalasa y SOD forman parte de otro sistema antioxidante (SOD/CAT). Sin embargo, se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas (Marini y col., 2006).

En la parte experimental de esta investigación se encontraron, de manera general, respuestas positivas en la inducción de enzimas antioxidantes (GST y GPx) con los diferentes extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens*, a las diferentes dosis administradas en ratas Sprague-Dawley. Para fines comparativos, en el Cuadro 9 se incluyen por órgano, extracto y dosis los mayores valores de respuesta que se obtuvieron en el presente estudio.

Como se muestra en el Cuadro 9 se encontraron respuestas positivas para los diversos extractos a sus distintas dosis administradas. Como se había mencionado con anterioridad, no se pudo llevar a cabo el análisis de la concentración de GSH en pulmón, intestino delgado, colon proximal y distal, debido a una falla eléctrica que produjo el descongelamiento de las muestras destinadas para este análisis, las cuales desafortunadamente no se pudieron rescatar. En base a los resultados obtenidos, el extracto con mayor poder de inducción en la concentración hepática de GSH fue el extracto metanólico (a las tres dosis), seguido por el extracto acuoso

(a las tres dosis). En riñón se presentó una respuesta positiva con el extracto total (a las tres dosis), seguido del extracto butanólico (altas dosis).

En cuanto a la enzima GST, se encontró que la mayoría de los extractos y sus diferentes dosis presentaron una reducción considerable en la actividad enzimática en hígado, ya que sólo el 16% de las diversas dosis presentaron una respuesta positiva con respecto al control negativo. Por el contrario, en riñón, pulmón e intestino delgado se presentó una inducción muy favorable de la actividad de GST en el 100% de los extractos y dosis administradas, seguida de la respuesta inductora en colon distal (91%) y colon proximal (49.9%). En riñón se presentó un mayor incremento con el extracto metanólico (a las tres dosis), seguido del extracto acuoso (50 y 100 mg/Kg); en pulmón con el extracto total (a las tres dosis); en intestino delgado se presentó un mayor incremento con el extracto metanólico (a las tres dosis), seguido del extracto butanólico (a las tres dosis). En colon distal se observa una tendencia marcada hacia el extracto acuoso como un potente inductor de GST a sus diversas concentraciones.

Se conoce la gran importancia del GSH, ya que éste es un fuerte nucleófilo que inactiva electrófilos derivados de carcinógenos, fármacos, contaminantes, etc., mediante la formación de conjugados catalizados por la glutatión-S-transferasa (GST). Existen diversos isotipos de GST pero el más predominante en hígado, riñón y en menor medida en pulmón es theta. El hígado contiene altos niveles de enzimas de clase alfa y en menor cantidad de enzimas de tipo pi; pero en el intestino la situación es contraria ya que abundan las enzimas de clase pi y en menor cantidad las de la clase alfa. Cada una de las GST es activada por espectros diferentes de sustancias electrofílicas y la diferente isoenzimas desempeñan un papel diferente en la desintoxicación de compuestos carcinogénicos y contaminantes ambientales. Lo anterior puede explicar la variación de los resultados observados en la presente investigación.

Cuadro 9. Porcentaje de inducción o inhibición enzimática (GST y GPx) y no enzimática (GSH) por órgano, extracto y dosis en ratas Sprague-Dawley.

	Hígado			Riñón			Pulmón			Intestino delgado			Colon proximal			Colon distal		
	GSH	GST	GPx	GSH	GST	GPx	GSH	GST	GPx	GSH	GST	GPx	GSH	GST	GPx	GSH	GST	GPx
Extracto Acuoso																		
50 mg/Kg	32.2	-17.1	181.5	-5.3	18.6	-43.3	-	11.1	-16.0	-	19.0	-20.6	-	-2.0	-20.3	-	22.6	114.6
100 mg/Kg	34.7	-3.3	204.8	-32.6	14.6	-22.6	-	35.5	141.3	-	7.9	-63.1	-	-2.1	-22.0	-	57.1	172.7
200 mg/Kg	37.1	-1.1	244.6	-28.3	5.2	-11.5	-	97.1	5.8	-	29.3	-25.9	-	-22.7	5.4	-	65.4	194.9
Extracto Metanólico																		
50 mg/Kg	45.8	1.2	101.5	-7.6	18.1	-26.1	-	52.3	18.8	-	24.9	-31.9	-	2.3	6.8	-	4.2	195.3
100 mg/Kg	45.9	-9	95.0	1.7	8.7	-45.8	-	84.1	41.2	-	47.7	-35.9	-	11.0	32.3	-	7.3	223.5
200 mg/Kg	45.9	11.1	122.9	4.1	22.4	7.6	-	21.0	97.1	-	51.6	-35.8	-	-15.2	42.5	-	10.3	8.7
Extracto Butanólico																		
50 mg/Kg	-27.2	-12.8	99.1	-45.5	12.8	-1.9	-	3.3	95.8	-	29.1	-30.3	-	19.2	35.6	-	56.1	107.4
100 mg/Kg	-28.3	5.8	41.3	39.3	4.2	19.7	-	68.0	63.6	-	31.0	-43.9	-	13.6	31.7	-	1.3	79.0
200 mg/Kg	-30.3	3.4	134.6	20.2	7.7	19.8	-	28.2	-23.6	-	27.6	-51.4	-	9.4	-3.1	-	-7.8	132.6
Extracto Total																		
50 mg/Kg	0	14.7	87.1	37.0	9.6	9.9	-	90.1	37.2	-	6.0	-18.0	-	-19.4	5.4	-	1.9	22.0
100 mg/Kg	13.3	25.1	139.9	35.1	5.1	-5.6	-	86.4	83.7	-	32.5	-17.9	-	16.6	1.0	-	20.1	47.4
200 mg/Kg	0.8	-15.4	81.6	33.2	14.2	-8.6	-	82.7	67.6	-	20.3	-30.3	-	-5.4	12.2	-	38.4	50.7

Los resultados para la enzima GPx indican una inducción en hígado y el colon distal por todos los extractos a las diversas dosis, significando un 100% de efectividad en la inducción de esta enzima en estos órganos; mientras que en riñón sólo el 33.3% de los extractos a las diversas concentraciones incrementaron favorablemente la actividad de GPx. En pulmón, el 83% de los extractos a sus diversas dosis propiciaron una respuesta favorable en la inducción de GPx. A pesar de que en el intestino delgado no se presentó ninguna respuesta positiva, por el contrario, la actividad enzimática estuvo por debajo de la del control negativo, en el colon proximal se observó una inducción en el 75% de los tratamientos. En base a lo anterior, tanto en hígado como en colon distal se observa una marcada tendencia hacia el extracto acuoso como un potente inductor de GPx a las diversas dosis. En riñón se presentó el mayor incremento de GPx con el extracto butanólico (a las dosis más altas); en colon proximal se presentó un mayor incremento con el extracto metanólico (a las tres dosis), seguido del extracto butanólico (a bajas dosis). Por el contrario, en pulmón no se identifica un extracto en específico como un potente inductor de GPx.

La GPx tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena; adicionalmente, esta enzima también elimina los peróxidos que se forman durante los procesos de óxido-reducción de las biotransformaciones de los compuestos xenobióticos en hígado. A este respecto, se muestra en este estudio que los mayores niveles inducidos de GPx se presentaron en hígado y colon distal.

Durante el desarrollo de esta investigación se utilizó como control positivo timol (200 mg/Kg), segundo componente mayoritario del aceite esencial de orégano e inductor de enzimas de fase II (Sasaki y col., 2005). Comparados con los resultados obtenidos por Sasaki y colaboradores en hígado de ratón, el incremento en la actividad enzimática GST y QR fue de entre 1.3 a 1.9 veces mayor que a su control negativo, lo que indica una inducción entre el 30% al 90% de actividad

enzimática. Cabe destacar que la diferencia entre especies utilizadas para el desarrollo experimental, así como las plantas y extractos utilizados, limitan las comparaciones entre investigaciones, pero enriquecen el observar el comportamiento de cada compuesto o planta en la modulación de enzimas antioxidantes. Sin embargo, en la mayoría de los casos en esta investigación no hubo diferencia significativa en el efecto del timol comparando con los extractos de orégano. Por el contrario, en la mayoría de los casos los extractos de orégano presentaron mayores niveles de inducción que el mismo timol. Esto da pauta para la búsqueda de diversos polifenoles como flavonoides (ampliamente estudiados) y otros compuestos antioxidantes naturales (como algunas vitaminas) con alto poder inductor de enzimas de fase II como alternativa para prevenir la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, y, en consecuencia, de enfermedades crónico degenerativas.

En general, los resultados del presente estudio indican que la potente o nula capacidad de inducir enzimas de fase II mostrada por los extractos puede estar limitada por las condiciones inherentes de fenotipo de cada órgano y la propia composición química de los diversos extractos administrados. Por lo tanto, estos resultados dan pauta para seguir investigando los mecanismos por los cuales estos extractos presentan estas singulares respuestas. También se observó que no hubo una marcada tendencia hacia un extracto en particular como un potente inductor de las enzimas destoxicantes/antioxidantes analizadas en esta tesis; sin embargo, se observan resultados favorables con el extracto metanólico, seguido del extracto acuoso, lo que sugiere la característica polar y medianamente polar de los compuestos con potencial inductor de estos mecanismos citoprotectores.

En lo que se refiere a los resultados de perfil lipídico en plasma, se encontró en general una respuesta favorable sobre los niveles de colesterol, ya que los extractos acuosos disminuyeron hasta en un 28% este parámetro (Cuadro 10), seguido de los extractos butanólico y total, en comparación al control negativo

(excepto el extracto metanólico a la concentración de 200 mg/Kg). Esto sugiere que el consumo de orégano ejerce un efecto hipocolesterolémico (baja los niveles de colesterol en la sangre), lo que puede ayudar en la prevención de enfermedades asociadas con los niveles altos de colesterol como las enfermedades cardiacas, entre otras. Por el contrario, los niveles de colesterol HDL, considerado como “benéfico”, se elevaron con los diversos tratamientos en comparación con el control negativo, sin identificarse un extracto en específico como un potente “inductor”. Esto es favorable ya que las moléculas de HDL son capaces de recoger los sobrantes de colesterol no aprovechados por el organismo y transportarlos nuevamente al hígado para su almacenamiento o en su defecto su excreción hacia el exterior por medio de la bilis (Topol, 2004). Estos resultados obtenidos son positivos para los fines de esta tesis cuyo objetivo fue evaluar los efectos biológicos benéficos de los diversos extractos del orégano mexicano *Lippia graveolens*, observándose que el 50% de los extractos a las diversas dosis presentaron este efecto hipocolesterolémico.

En cuanto a la concentración de triglicéridos, se encontraron niveles mayores a un 15% en los diversos grupos tratados en comparación al control negativo, observándose un mayor efecto con el extracto acuoso en un 142.6% a la dosis de 50 mg/Kg. Los triglicéridos muy elevados pueden provocar pancreatitis, agrandamiento del hígado y el bazo y depósitos grasos en la piel conocidos como xantomas (Topol, 2004).

En el Cuadro 10 se muestran los porcentajes de incremento y disminución en concentraciones de triglicéridos por dosis y por extracto.

La regulación de los lípidos por vía exógena comienza en la pared intestinal donde los triglicéridos y el colesterol se incorporan a lipoproteínas de gran tamaño (quilomicrones) que son transportados a través de la linfa a la circulación.

Cuadro 10. Porcentajes de incremento y disminución en los niveles de glucosa y perfil lipídico por extracto y dosis.

	Colesterol	Colesterol HDL	Triglicéridos	Glucosa
Extracto Acuoso				
50 mg/Kg	-28.2	-22.5	142.6	48.3
100 mg/Kg	-23.1	14.7	70.1	45.1
200 mg/Kg	-21.1	-11.3	69.7	25.7
Extracto Metanólico				
50 mg/Kg	-10.6	9.7	16.5	36.2
100 mg/Kg	-3.2	-3.6	27.3	27.2
200 mg/Kg	14.1	-4.1	41.5	36.4
Extracto Butanólico				
50 mg/Kg	-12.5	19.6	47.5	72.3
100 mg/Kg	-14.0	-20.6	56.6	70.8
200 mg/Kg	-2.4	2.0	70.1	57.5
Extracto Total				
50 mg/Kg	-17.7	-3.3	22.6	30.7
100 mg/Kg	-4.6	25.8	15.3	50.0
200 mg/Kg	-2.9	6.2	21.2	57.9

Los ácidos grasos atraviesan las células endoteliales y penetran en los adipocitos y el músculo. Los remanentes de los quilomicrones que quedan en la circulación son captados por el hígado. El resultado neto es el suministro de triglicéridos al tejido adiposo y de colesterol al hígado; mientras que por vía endógena, el hígado sintetiza triglicéridos y los secreta al torrente circulatorio, junto con el colesterol, bajo la forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las partículas de VLDL son grandes, transportan de 5 a 10 veces más triglicéridos que ésteres del colesterol, y, al igual que otras lipoproteínas, están revestidas de apoproteínas que

las dirigen a tejidos en los que la lipoproteinlipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos. Los remanentes de VLDL o bien regresan al hígado para su reutilización o son procesados para convertirse en lipoproteína de baja densidad (LDL) (Fong, 2003). Las LDL suministran colesterol a las células extrahepáticas como las de la corteza suprarrenal, linfocitos, músculos o riñón. Las LDL se unen a receptores específicos situados en las superficies celulares y después experimentan una endocitosis y digestión por los lisosomas. El colesterol liberado se utiliza para la síntesis de membranas y las necesidades metabólicas. A medida que las membranas celulares se van recambiando, el colesterol no esterificado se libera al plasma, donde se liga inicialmente a la lipoproteína de alta densidad (HDL) y es esterificado con lecitina por la acción de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT). Los ésteres de colesterol de las HDL son transferidos a las VLDL y en última instancia a las LDL. Merced a este ciclo, las LDL suministran colesterol a las células y el colesterol regresa de los lugares extrahepáticos a través de las HDL (Baynes y Dominiczack, 2004).

Cuando los triglicéridos aumentan en sangre por arriba de los valores normales, este trastorno se denomina hipertrigliceridemia. Entre los factores que contribuyen a elevar los triglicéridos tenemos: obesidad, sobrepeso, sedentarismo, tabaquismo, exceso en el consumo de alcohol, dietas con excesivo consumo de carbohidratos, ciertas enfermedades, medicamentos y desórdenes genéticos. La hipertrigliceridemia se asocia con enfermedades cardiovasculares; sin embargo, el riesgo es mayor cuando el colesterol también se encuentra elevado.

Por último, se encontró que todos los extractos a las diversas dosis elevaron considerablemente los niveles de glucosa, lo cual nos hace pensar que si el orégano se llegara a usar como un suplemento, fármaco o con cualquier otro fin nutracéutico, éste no podría ser consumido por aquellas personas que sufren de niveles de azúcar altos (diabéticos). En el Cuadro 10 se hace una comparación con respecto al control negativo, donde se puede observar los porcentajes de

incremento en cuanto a los niveles de glucosa por extracto y dosis. Adicionalmente, se puede observar una relación marcada entre los de triglicéridos y glucosa, ya que en todos los grupos tratados con los extractos a las tres dosis se observa un incremento en los niveles de triglicéridos y glucosa. Lo anterior puede deberse a que los triglicéridos son transportados por la lipoproteína VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad), la cual se sintetiza en grandes cantidades en el hígado debido a la alta concentración de azúcares simples, y son liberados al torrente sanguíneo aumentando de esta forma la concentración de triglicéridos en sangre, lo que significa un alto riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

La glucosa es el carbohidrato más importante en los mamíferos, por ser su principal fuente de energía y, la única, en el feto y los tejidos glucodependientes (retina, eritrocitos y el epitelio germinativo de las gónadas). Además de esta vital función, la glucosa tiene otra de gran importancia, por ejemplo: puede almacenarse como glucógeno, se puede transformar en lípidos, origina la ribosa para los ácidos nucleicos y puede formar complejos con proteínas como en el glucocáliz (Baynes y Dominiczack, 2004). Sin embargo, la enfermedad más común relacionada con el metabolismo de la glucosa es la diabetes mellitus que se caracteriza por la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre. Otra enfermedad relacionada con el metabolismo de esta molécula es la obesidad, por lo que el control o mantenimiento de los niveles de glucosa es un factor importante contra el desarrollo de diversas enfermedades crónico degenerativas.

VIII. CONCLUSIONES

Como conclusión de este trabajo de tesis se demostró que los extractos de orégano mexicano *Lippia graveolens* son capaces de inducir enzimas de fase II y el cofactor GSH, confiriéndole una propiedad nutracéutica al orégano. También se observó la inducción de estas enzimas en los diferentes órganos, siendo de gran importancia los resultados en hígado, riñón y colon distal para los intereses del grupo de trabajo; sin embargo, los efectos observados en pulmón e intestino delgado abren otras áreas de estudio. En lo que se refiere al perfil lipídico, se demostró que dichos extractos son capaces de reducir los niveles de colesterol y elevar los niveles de colesterol HDL en plasma, siendo otro punto a su favor como alimento nutracéutico. Por el contrario, también se elevaron los niveles de triglicéridos y glucosa, lo cual sugiere considerar con precaución estos resultados en aquellos sujetos o pacientes con niveles elevados de estos parámetros.

Cabe mencionar que esta es la primera investigación de este tipo, ya que no se encuentra en la bibliografía investigaciones y resultados comparables con este trabajo de investigación. Por lo anterior, los resultados derivados de esta tesis pueden dar pie a numerosas investigaciones que motiven a seguir indagando sobre las propiedades nutracéuticas del orégano y de otras especies nativas de México.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Ah-Ng, T., Changjiang, X., Yong-Tao, C. 2005. Induction of Phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacology*. Vol. 28: 249-268.

Albertson, D., Bissell, M., Godden, E., Leake, D., Levy, D., Liu, H., Littlepage, L., Nelson, C., Nieto, A., Radisky, D., Werb, Z. 2005. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature Publishing Group*. Vol. 436: 123-127.

Albano, E. 2005. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the Nutrition Society*. Vol. 65: 278–290.

Al-Gubory, K. H., Bolifraud, P., Germain, G., Nicole, A., Ceballos-Bicot, I. 2004. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Society for Reproduction and Fertility*. Vol. 128: 767-774.

Andreyev, A., Kushnareva, E., Starkov, A. 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*. Vol. 70: 200-214.

Arvindakshan, M., Chen, Y., Chung, S., Ellery, C., Ho, E., Lam, K., Oates, P., Yamagishi, S., Yip, J. 2006. Aldose reductase–deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH₂-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes*. Vol. 55: 1946-1953.

Baglioni, M., Bastiani, P., Cecchetti, R., Cornacchiola, V., Malavolta, M., Mangialasche, F., Mariani, E., Mecocci, P., Mocchegiani, E., Polidori, M. 2006. Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status. *Biogerontology*. Vol. 7: 391–398.

Balletbó, M., Yonkman, F., Setter, F. 2001. *The Netter collections of medical illustration*. Tomo 4, Elsevier, España: 203.

Baynes, J., Dominiczak, M. 2004. *Bioquímica médica*. 2a ed., Elsevier, España: 511.

Bello, G., López, C. 2001. *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*, Ediciones Díaz de Santos, España: 137.

Bishop, C., Hudson, V., Milton, S., Wilde, C. 2005. A pilot study of the effect of inhaled buffered reduced glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis. *Journal of the American College of Chest Physicians*. Vol. 127: 308-317.

Butterfield, A., Calíbrese, V., Curró, D., De Marco, C., Mancuso, C., Scapagnini, G., Stella, A. 2007. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Bioscience*. Vol. 12: 1107-1123.

Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramírez, O., Figueroa, L., Teracena, A., Samayoa, B. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorder. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol.38: 31-38.

Compadre, C, Robins, E., Kinghorn, D. 1986. The intensely sweet herb, *Lippia graveolens* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 15: 89-106.

CONAFOR, 2001.

<http://www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/fichas%20Tecnicas/Lippia%20graveolens.pdf>

Crabb, J., Maeda, A., Palczewski, K. 2005. Microsomal glutathione S-transferase 1 in the retinal pigment epithelium: Protection against oxidative stress and a potential role in aging. *Biochemistry*. Vol. 44: 480-489.

Devasagayam, T., Tilak, C., Bloor, K., Sane, K., Ghaskadbi, S., Lele, R. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*. Vol. 52: 794-804.

Dinkova-Kostova, A.T., Liby, K.T., Stephenson, K.K., Holtzclaw, W.D., Gao, X, Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G.W., Sporn, M., Talalay, P. 2005. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. Vol. 102(1): 4584-4589.

Domínguez, X., Sánchez, H., Suárez, M., Baldas, J., González, R. 1998. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Medica*. Vol. 55: 208-209.

Dunford, N., Silva, R. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*. Vol. 7: 20-22.

Ellman, G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 82: 70-79.

Forestieri, A., Monforte, M., Ragusa, S., Trovato, A., Iauk, L. 1996. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in Africa medicine. *Phytotherapy Research*. Vol. 10: 100-106.

Fong, I. 2003. Infections and the cardiovascular system: new perspectives. 1a. Ed., Springer, United state of America: 95-96.

Foyer, C. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *American Society of Plant Biologists*. Vol. 17: 1866-1875.

Gaeda, J., Gumbao, D., Matás, C., Romar, R. 2005. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology*. Vol. 26: 749-756.

García, L., Rojo, D., García, L., Hernández, H. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Rev. Cubana Investigación Biomédica*. versión impresa ISSN 0864-0300.

García, R. 2004. Glutathión-S-transferasa como sistema protector en los procesos neuro degenerativos. *Ciencias Biológicas*. Vol. 35: 56-58.

González, M., Hernández, M., Kite, G., Martínez, M. 2007. Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C.* ISSN (Versión impresa): 0187-7380 MÉXICO.

Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249: 7130-7139.

Hagen, T., Jang, Y., Judge, S., Leeuwenburgh, C., Smith, A. 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *The FASEB Journal*. Vol. 19: 419-421.

Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*. Vol. 11(4):1365-402.

Hernandez, M., Prieto, E. 1999. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cubana de Investigación Bionomedica*. Vol.18(1): 12-4.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53: 1841-1856.

Johnson, I., Saltmarsh, M., Scalbert, A. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Society for Clinical Nutrition*. Vol. 81: 215s-217s.

Lecomte, T., Landi, B., Beaune, P., Laurent-Puig, P., Lorient, M. 2006. Glutathione-S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clinical in Cancer Research*. Vol. 12(10): 3050-3056.

Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Scalbert, A. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Food Science and Nutrition*. Vol. 45:287–306.

Mariani, E., Cornacchiola, V., Polidori, M., Mangialasche, F., Malavolta, M., Cecchetti, R., Bastiani, P., Baglioni, M., Mocchegiani, E., Mecocci, P. 2006. Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status. *Biogerontology* (2006) 7:391–398

Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2002. *Bioquímica*. 3ra. ed., Pearson Educación, Madrid: 1290.

Morton, A. 1981. In *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*, Vol. I Springfield, Illinois, USA: 745-750

Munday, R., Munday, C., Munday, J. 2005. Hemolytic anemia and induction of Phase II detoxification enzymes by diprop-1-enyl sulfide in rats: Dose-response study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53: 9695-9700.

Mulvihill, E., Huff, M. 2010. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *Can J Cardiol. (suppl)*:17A-21A.

Novo, E., Parola, M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. Vol. 1: 1-58.

Ortega, A., Mena, S., Estrela, J. 2010. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers*. Vol. 2: 274-304.

Pagana, K., Pagana, T. 2001. *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Referente*. 5 ed., Elsevier, España: 603.

Papas, A. 1998. Antioxidant status, diet, nutrition and health. 1ra. ed., CRC Press, USA: 3-4, 14-16, 23, 237.

Plagia, D., Valentine, N. 1976. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Vol. 70: 158-169.

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

Rastrelli L., Caceres, A., Morales, C., De Simone, F., Aquino, R. 1998. Iridoides from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*. Vol 49: 1829-1832.

Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K: from Guatemala. *Planta Médica*. Vol. 69: 80-83.

Salvadó, R. J. 2005. Efecte antigenotòxic i modilator de l'expressió d'enzims antioxidants per procianidines del vi negre en condicions d'èxtrés oxidatiu. Univeritat Rovira i Virgili. Tarragona, Italia. Tesis para obtener el título de Doctora en Bioquímica: 26.

- Sasaki, K., Wada, K., Tanaka, Y., Yoshimura, T., Mutuoka, K., Anno, T. 2005.** Thyme (*Thymus vulgaris L.*) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. *Journal of Medicinal Food*. Vol. 8(2): 184-189.
- Scalbert, A. Johnson, I. Saltmarsh, M. 2005.** Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*;81(suppl):215S–7S
- Serafini, M., Santos, R., Guimarães, A., Dos Santos J., da Conceição Santos, A., Alves I., Gelain D., de Lima Nogueira, P., Quintans-Júnior, L., Bonjardim, L., de Souza, A. 2010.** Morinda citrifolia Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration *Journal of Medicinal Food*. Vol. 0 (0): 0254.
- Storz, P. 2005.** Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*. Vol. 10: 1881-1896.
- Topol, E. 2004.** Miocariopatia hipertrofica obstructiva. 4^a. Ed.,Elsevier, España: 138.
- Turgut, N. Silva, R. 2005.** Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*. Vol. 7(1):20-22.
- Xu, C., Yong-Tao, C., Tony Kong, A. 2005.** Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Arch Pharm Res*. Vol. 28(3): 249-268.
- Zhang, H., Liao, L. H., Liu, S. M., Lau, K. W. Lai, A. K., Zhang, J. H., Wang, O., Chen, X. O., Wei, W. Liu, H., Hua, J., Lung, M. L. Tai, S. S. W., Wu, M. 2007.** Microsomal glutathione S-transferase gene polymorphisms and colorectal cancer risk in a Han Chinese population. *Journal of Colorectal Disturbances*. Vol. 22: 1185-