

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE INFUSIONES COMERCIALES SOBRE LAS
ALTERACIONES RENALES EN UN MODELO DE OBESIDAD
INDUCIDA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANDREA HERNÁNDEZ MENDOZA

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE INFUSIONES COMERCIALES SOBRE LAS
ALTERACIONES RENALES EN UN MODELO DE OBESIDAD
INDUCIDA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ANDREA HERNÁNDEZ MENDOZA

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO
PRESIDENTE

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SECRETARIO

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
VOCAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
SUPLENTE

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Definición de obesidad	3
II.1.1 El problema de la obesidad	3
II.1.2 Índice de masa corporal	3
II.2 Tejido adiposo	4
II.3 Estrés oxidativo	4
II.3.1 Estrés oxidativo y su relación con la obesidad	6
II.4 Patologías secundarias generadas a causa de la obesidad	7
II.4.1 Daño renal como consecuencia en la obesidad	7
II.7 Infusiones y su repercusión en la obesidad	8
II.7.1 Infusiones	8
II.7.2 Infusiones estudiadas	9
II.7.2.1 Té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	9
II.7.2.2 Infusión de manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	10
II.7.2.4 Infusión de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>)	11
II.7.2.5 Infusión de toronja (<i>Citrus Paradise</i>)	12
II.7.2.6 Infusión de alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	12
IV. HIPÓTESIS	14
V. OBJETIVOS	15
V.1 General	15
V.2 Específicos	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
VI.1 Material	16

VI.1.1 Infusiones comerciales y preparadas utilizadas	16
VI.1.2 Material biológico utilizado	16
VI.1.3 Dieta	16
VI.2. Métodos	17
VI.2.1 Determinaciones en las Infusiones	17
VI.2.1.1 Determinación de fenoles totales por el método Foulin-Ciocalteu	17
VI.2.1.2 Determinación de flavonoides totales	17
VI.2.1.3 Determinación de taninos condensados	18
VI.2.1.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS	18
VI.2.1.5 Determinación de la oxidación de LDL <i>in vitro</i>	19
VI.2.1.6 Determinación de la oxidación de proteína <i>in vitro</i>	19
VI.2.2 Estudios <i>in vivo</i>	20
VI.2.2.1 Tratamiento	20
VI.2.2.2 Mediciones semanales	20
VI.2.3 Sacrificio	20
VI.2.4 Determinaciones en muestras biológicas	21
VI.2.4.1 Determinación del efecto de las infusiones sobre el modelo de obesidad inducida	21
VI.2.4.1.1 Peso corporal e índice de masa corporal (IMC)	21
VI.2.4.1.2 Perfil de lípidos	21
VI.2.4.1.3 Determinación de triglicéridos en tejido adiposo	21
VI.2.4.1.4 Determinación de triglicéridos en hígado	22
VI.2.4.2 Determinación del efecto del consumo de	23

infusiones sobre parámetros relacionados con alteraciones renales.	
VI.2.4.2.1 Determinación de proteína en orina	23
VI.2.4.2.2 Determinación de creatinina	23
VI.2.4.2.3 Determinación de urea	23
VI.2.4.2.4 Determinación de enzimas	24
Antioxidantes	
VI.2.4.2.4.1 Preparación de citosoles para Catalasa	24
VI.2.4.2.4.2 Determinación de la concentración de proteína en los citosoles	25
VI.2.4.2.4.3 Determinación de la actividad de la catalasa	25
VI.2.4.2.4.4 Preparación de los citosoles para la determinación de glutatión reducido (GSH) y glutatión S-transferasa (GST)	26
VI.2.4.2.4.5 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)	26
VI.2.4.2.4.6 Determinación de la actividad glutatión S-transferasa (GST)	27
VI.2.4.2.5 Determinación de peroxidación lipídica en riñón	27
VI.2.4.2.6 Cuantificación de proteínas en Musculo.	28
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29

VIII.1 Composición de compuestos fenólicos totales en las infusiones herbales estudiadas.	29
VIII.2 Capacidad antioxidante de las infusiones herbales estudiadas.	32
VIII.3 Efecto de las infusiones estudiadas sobre el modelo de obesidad inducida.	35
VIII.4 Efecto de las infusiones estudiadas sobre el metabolismo de lípidos.	36
VIII.5 Protección antioxidante en riñón de las infusiones estudiadas.	40
VIII.6 Efecto de las infusiones sobre la protección renal en un modelo de obesidad inducida.	44
IX. CONCLUSIONES	47
IX. BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre el peso y el índice de masa corporal (IMC ²) en un modelo de obesidad inducida en ratas Sprague-Dawley.	36
2	Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre los niveles de colesterol total, HDL y LDL en suero de ratas Sprague-Dawley bajo un modelo de obesidad inducida.	38
3	Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre los niveles de triglicéridos en suero, tejido adiposo e hígado de ratas Sprague-Dawley en un modelo de obesidad inducida.	39
4	Concentración de fenoles totales, flavonoides y taninos en las infusiones estudiadas.	42
5	Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre parámetros de funcionamiento renal de ratas Sprague-Dawley bajo un modelo de obesidad inducida.	45
6	Efecto de las diferentes infusiones sobre la concentración proteica en orina y músculo de ratas Sprague-Dawley con obesidad inducida.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistemas enzimáticos generadores y mediadores de ERO.	5
2	Papel del estrés oxidativo sobre la inflamación e inducción de la síntesis de ácidos grasos en un estado de obesidad	7
3	Diferentes mecanismos bajo los cuales se genera daño renal durante la obesidad.	8
4	Concentración de fenoles totales, flavonoides y taninos en las infusiones estudiadas.	30
5	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> reportado como la concentración inhibitoria media para los ensayos de ABTS, oxidación de proteína y LDL oxidada para cada una de las infusiones estudiadas.	34
6	Capacidad antioxidante <i>in vivo</i> de las infusiones estudiadas evaluada en riñón de ratas Sprague-Dawley bajo un modelo de obesidad inducida reportado en niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).	44

RESUMEN

La obesidad se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa producida por un incremento de la lipogénesis generando un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. En México, las infusiones se han utilizado desde tiempos remotos, y en los últimos años se ha destacado su potencial antioxidante y antiobesigénico. En el presente trabajo se determinó el efecto del consumo de algunas infusiones de uso común en nuestra población sobre la disminución de peso corporal y su actividad antioxidante *in vivo*, en un modelo de obesidad inducido con dieta. Se prepararon las siguientes infusiones al 1 %; hierbabuena (*Mentha piperita*), manzanilla (*Matricaria recutita*), alcachofa (*Cynara scolymus*), toronja (*Citrus Paradise*) y té verde (*Camellia sinensis*) las cuales se proporcionaron como agua de beber durante 12 semanas. Se cuantificó el contenido de fenoles totales a las infusiones, así como su capacidad antioxidante (ABTS), inhibición de la oxidación de LDL y proteínas *in vitro*. Se cuantificó el peso corporal cada mes. Se evaluó perfil lipídico en suero, así como el contenido de triglicéridos en tejido adiposo e hígado. De igual forma, se analizó la actividad de enzimas como catalasa y glutatión S-transferasa (GST) así como la concentración de glutatión reducido (GSH) en riñón, así como la protección contra daño renal determinando peroxidación lipídica, depuración de creatinina, cuantificación de urea (suero y orina), y proteínas en orina y tejido muscular. Los resultados *in vitro* muestran como las infusiones de alcachofa y toronja presentaron menor contenido fenólico y capacidad inhibitoria media mayor respecto a las demás lo que sugiere que la baja capacidad antioxidante se debe al bajo contenido fenólico. Sin embargo, dentro de los resultados *in vivo* estas infusiones presentaron mejor capacidad antioxidante y protección renal presentando niveles menores de TBARS para el caso de alcachofa, y evitando el incremento en urea y creatinina respecto al control obeso mostrando que los resultados observados *in vitro* no siempre reproducen su efecto *in vivo*. De igual forma las infusiones de alcachofa y toronja disminuyeron parámetros como el peso, LDL y triglicéridos en tejido adiposo, al igual que hierbabuena mostrando que las infusiones de alcachofa y toronja fueron mejores que las demás infusiones del estudio.

I. INTRODUCCIÓN

Es conocido que hoy en día la obesidad ocupa un lugar alarmante dentro las cifras mundiales, ya que ha aumentado el número de individuos clasificados con obesidad, siendo México uno de los países con mayor prevalencia de esta enfermedad.

Esta enfermedad crónico degenerativa, que se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa, repercute en la salud de quien la padece generándole daños secundarios que desencadenan otras patologías, tales como afecciones cardíacas, hipertensión, resistencia a la insulina generando diabetes mellitus tipo II, daño renal y hepático.

El riesgo se genera a partir del proceso inflamatorio que lleva a cabo el tejido adiposo en individuos con obesidad, debido a la producción de diversas citocinas. A la par se genera un estado de estrés oxidativo, en el cual se tiene un desequilibrio entre enzimas antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ERO), desencadenando el daño generado en otros tejidos y órganos.

Por esta razón, se ha profundizado en el estudio de compuestos antioxidantes que reduzcan el daño generado en la población con obesidad, previniendo con ellos el desarrollo de las complicaciones. Entre estos compuestos se encuentran diversos flavonoides y compuestos fenólicos, contenidos en diferentes variedades de infusiones, los cuales cobran importancia en sociedades como la mexicana, ya que en nuestra cultura, el consumo de diferentes infusiones con enfoque terapéutico tiene una gran relevancia.

Entre las infusiones de mayor consumo en México y a las cuales se les han identificado compuestos antioxidantes encontramos la manzanilla (*Matricaria recutita*) y hierbabuena (*Mhenta piperita*). Por otro lado en los últimos años se ha incrementado el consumo de alimentos como la toronja y la alcachofa, las

cuales son consumidas por la población para la disminución de peso corporal; sin embargo, no se ha determinado el efecto antiobesigénico de sus infusiones.

Con base a lo anterior, surge el interés de evaluar infusiones que se han utilizado para la disminución de procesos inflamatorios locales, así como aquellas que se han propuesto con capacidad para disminuir el peso corporal. Además, estudios *in vitro* como la cuantificación del contenido fenólico han mostrado que algunas infusiones de consumo en México tienen una concentración importante de fenoles, los cuales están relacionados con la disminución de peso corporal. Así mismo, dichos fenoles poseen una capacidad antioxidante lo que sugiere que podrían también presentar posibles beneficios a la salud relacionados con la disminución del estrés oxidativo crónico, que sucede en la obesidad y sus complicaciones.

Considerando que las infusiones mencionadas son ampliamente consumidas en nuestro país, la presente investigación busca determinar si el consumo de diferentes infusiones herbales tiene algún efecto sobre la disminución en el peso corporal en un modelo de obesidad inducido por alimentación en ratas Sprague-Dawley, de igual forma, evaluar su capacidad en la disminución de riesgos secundarios como el estrés oxidativo generado por la acumulación de grasa, para mostrar si tienen efecto en la prevención a generar patologías secundarias.

II. ANTECEDENTES

II.1 Definición de obesidad

II.1.1 El problema de la obesidad

La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede perjudicar la salud. Los últimos cálculos de la OMS 2008 indican que a nivel mundial, más de 200 millones de hombres y casi 300 millones de mujeres son obesos (OMS, 2008).

Aunado a las cifras mundiales, la situación actual en el país es de igual forma alarmante, ya que México ocupa el segundo lugar en obesidad en adultos a nivel mundial, englobando como los dos factores principales asociados a esta obesidad, el sedentarismo y exceso en la ingestión de alimentos hipercalóricos, ricos en grasas y azúcares, pero con escasas vitaminas, minerales y otros micronutrientes.

De igual forma, la fructosa se ha convertido en un componente importante de nuestra dieta moderna, lo cual, aunado a la dieta alta en grasa, tiene repercusiones sobre el proceso de lipogénesis y la acumulación de grasa en un estado de obesidad (Tappy y Lê, 2009).

Por estas razones se considera a la obesidad una pandemia causada en gran parte por una combinación de diferentes factores como genéticos, la eficiencia metabólica y un ambiente moderno que cuenta con alimentos ricos en calorías, apetecibles al consumidor y de bajo precio.

II.1.2 Índice de masa corporal

El índice de masa corporal (IMC), el cual es el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2), es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el

sobrepeso y la obesidad en los adultos, tanto a nivel individual como poblacional. En los adultos mexicanos, existen 24.2 % de la población masculina obesa y 34.5 % de la población femenina obesa con un IMC \geq 30 (OMS, 2008).

II.2. Tejido adiposo

El tejido adiposo representa la principal fuente de ácidos grasos libres para el uso de energía y producción de calor. Existen dos tipos de tejido adiposo presentes en los mamíferos: el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo marrón, los cuales no sólo tienen funciones diferentes, sino también una composición y localización celular diferente.

El tejido adiposo blanco constituye la mayor parte de tejido adiposo del cuerpo proporcionando la mayor parte de la grasa corporal total, a la vez es la fuente de ácidos grasos libres, utilizados como sustratos energéticos. Es posible identificar varios subgrupos de tejido adiposo, incluyendo visceral y muscular. Sus funciones clave son el control del metabolismo a través de la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina. Además, éste afecta el estado de inflamación a través de un mecanismo de control mediado por moléculas antiinflamatorias y la activación de las vías metabólicas e inmunitarias (Balistreri y col., 2010).

II.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio persistente entre la producción de especies moleculares altamente reactivas y las defensas antioxidantes, lo cual puede estar relacionado con la acumulación de grasa en humanos (Qatanani y Lazar, 2007).

Las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno son ejemplos de radicales libres. Más del 90 % de la formación de especies

reactivas de oxígeno ocurre en la mitocondria durante el metabolismo de oxígeno cuando algunos de los electrones directamente reducen a las moléculas de oxígeno (Gosmanova y Le, 2011). Además, las EROs son sintetizadas en las células fagocíticas, así como en la pared vascular y en varios tejidos por enzimas como la NAD(P)H oxidasa, mieloperoxidasa, la xantina oxidasa, la ciclooxygenasa y lipoxigenasa (Figura 1).

Cuando las especies reactivas de oxígeno están presentes en exceso, éstas pueden reaccionar con diversas moléculas tales como los lípidos, carbohidratos, proteínas y el ADN, alterando su estructura y función, lo que resulta en el daño celular que conduce a procesos patológicos. Estas reacciones perjudiciales son controladas por un sistema antioxidante (enzimático y no enzimático) que elimina radicales libres. Entre los principales antioxidantes enzimáticos se encuentran superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT). Entre los sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos se encuentran los denominados como glutatión, tioles, carotenoides mixtos y los bioflavonoides (Gosmanova y Le, 2011).

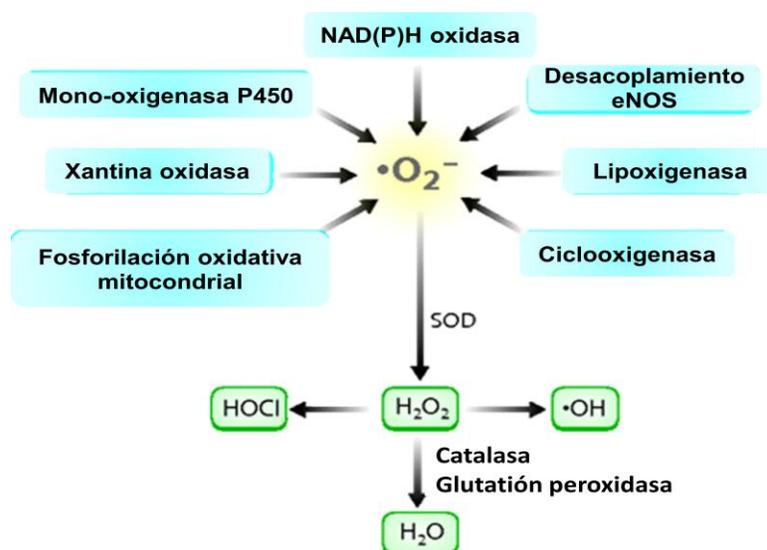


Figura 1. Sistemas enzimáticos generadores y mediadores de ERO (Modificado de Sachse y Wolf, 2007).

II.3.1 Estrés Oxidativo y su relación con la obesidad

El estrés oxidativo está altamente correlacionado con una amplia variedad de enfermedades inflamatorias y metabólicas, como la obesidad (Noeman y col., 2011). Como se mencionó, las especies reactivas de oxígeno causan daño directo ó indirecto en diferentes órganos.

Se ha demostrado que la obesidad puede inducir estrés oxidativo sistémico y a su vez, éste se ve asociado con una producción irregular de adipocinas (Fernández-Sánchez y col., 2011). Durante la obesidad se genera la acumulación de tejido adiposo lo que da lugar a un proceso inflamatorio (Figura 2) activado por el aumento de éste en los sitios metabólicamente activos, lo que genera un fuerte aumento en los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias, definidas generalmente como adipocinas (Balistreri y col., 2010).

La sensibilidad en la detección de biomarcadores de daño oxidativo es mayor en individuos con obesidad y se correlacionan directamente con el índice de masa corporal (IMC), el porcentaje de grasa corporal, la oxidación de LDL y los niveles de triglicéridos; por el contrario, los marcadores antioxidantes de defensa son más bajos de acuerdo al grado de obesidad (Fernández-Sánchez y col., 2011).

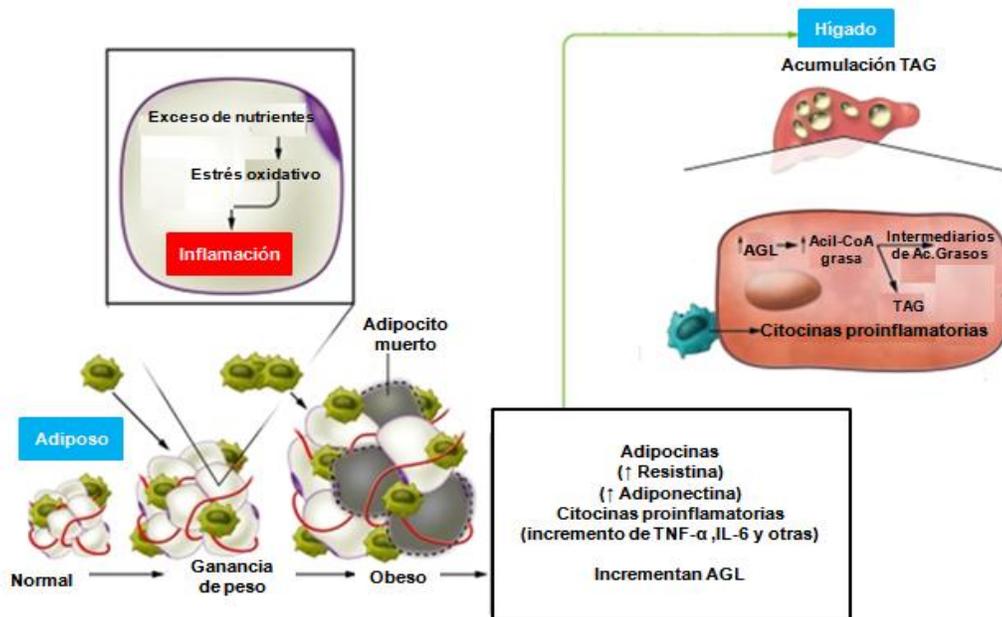


Figura 2. Papel del estrés oxidativo sobre la inflamación e inducción de la síntesis de ácidos grasos en un estado de obesidad (Modificado de Schenk y col., 2008).

II.4 Patologías secundarias generadas a causa de la obesidad

La obesidad es un factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares e hipertensión conllevando a un daño renal (Pi-Sunyer, 2009).

Dentro de las diversas disfunciones que se presentan durante la obesidad y que generan estas patologías secundarias se encuentran la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, hiperleptinemia, metabolismo de lípidos anormales, aumento de presión arterial, entre otras. Una característica importante es que todas estas patologías se encuentran asociadas al estrés oxidativo e inflamación (Do Carmo y col., 2009).

II.4.1 Daño renal como consecuencia en la obesidad

El estrés oxidativo generado durante la obesidad se ha señalado como una de las causas relacionadas con las lesiones renales. Las especies reactivas de

oxígeno son moléculas que también generan oxidación de lípidos, proteínas y daño celular en riñón promoviendo con ello lesión glomerular y proteinuria (Figura 3). De igual, forma la inflamación presente en un estado de obesidad aunado al estrés oxidativo, inducen daño al glomérulo y túbulo renal dando como resultado la disfunción renal (Tang y col., 2012).

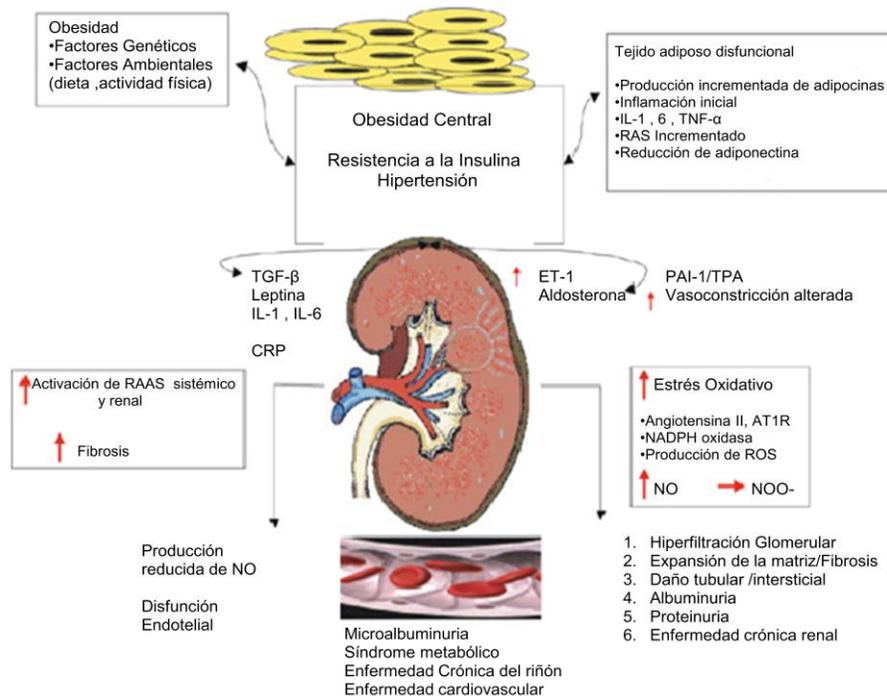


Figura 3 .Diferentes mecanismos bajo los cuales se genera daño renal durante la obesidad (Modificado de Sowers, 2007).

II.5. Infusiones y su repercusión en la obesidad

II.5.1 Infusiones

El té es una de las bebidas más populares consumidas en todo el mundo. El creciente interés en los beneficios que éste aporta a la salud ha llevado a la incorporación de sus extractos en los suplementos dietéticos y alimentos funcionales.

Las prevalencias de sobrepeso, obesidad y diabetes han aumentado con rapidez en México y las bebidas representan la quinta parte de la energía que consumen los mexicanos y se sabe que las bebidas con aporte energético incrementan el riesgo de obesidad. Conociendo ésto y considerando los beneficios y riesgos para la salud y nutrición al igual que el patrón de consumo de las bebidas en México, se elaboró una clasificación de las bebidas en seis categorías de acuerdo con su contenido energético, valor nutricional y riesgos a la salud en una escala que clasifica las bebidas de la más (nivel 1) a la menos (nivel 6) saludable, dentro de la cual se clasificó en el tercer nivel a las infusiones sin azúcar (Rivera y Muñoz-Hernández, 2008), mostrando que el consumo de infusiones genera beneficios nutricionales y de salud creciendo el interés de su promoción dentro de la población como alternativa para reducir el consumo de otras bebidas que promuevan el aumento en los índices de obesidad.

II.5.2 Infusiones estudiadas

II.5.2.1 Té verde (*Camellia sinensis*)

El té de la planta *Camellia sinensis* se consume en diferentes partes del mundo como: té verde, negro u oolong. De todos éstos, los efectos más significativos sobre la salud humana se han observado con el consumo de té verde. Durante el proceso de secado, el té verde mantiene niveles importantes de polifenoles con propiedades promotoras a la salud considerando que muchos de sus efectos benéficos están relacionados con su contenido de catequinas.

El consumo, entre la población, a largo plazo de las catequinas del té muestran beneficios contra la obesidad, diabetes tipo II y enfermedad coronaria (Chacko y col., 2010). Las catequinas y polifenoles del té son eficaces contra las especies reactivas de oxígeno *in vitro* y también pueden funcionar como antioxidantes indirectamente a través de sus efectos sobre los factores de transcripción y las actividades enzimáticas. En los seres humanos, se han observado aumentos de

la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo del té verde y sus catequinas. Con ello, los efectos del té verde sobre los biomarcadores de estrés oxidativo, parecen muy prometedores en modelos animales (Higdon y Frei, 2003).

De igual forma, el efecto del consumo de catequinas de té verde en voluntarios humanos sanos (500 mg / día) durante 4 semanas mostró una reducción del 18 % en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad en plasma, en comparación con individuos que no las consumieron (Yang y col., 2009). Estas evidencias muestran así el efecto benéfico que tiene el té verde sobre alteraciones que pueden presentarse durante la obesidad, conociendo que en su mayoría su acción se debe al contenido de polifenoles encontrados en éste siendo posible dilucidar un mecanismo de acción bajo el cual generan su efecto.

II.5.2.2 Infusión de manzanilla (*Matricaria recutita*)

La manzanilla es uno de los ingredientes más populares utilizados en la preparación de infusiones. La infusión de manzanilla se utiliza frecuentemente para varios fines medicinales como enfermedades del tracto gastrointestinal, colitis y gastritis (Rodríguez-Fragoso y col., 2008).

Se han identificado aproximadamente 120 metabolitos secundarios en la manzanilla, entre ellos 36 flavonoides. Componentes importantes de las flores incluyen varios compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides apigenina, quercetina, patuletina como glucósidos y diversos derivados acetilados. Entre los flavonoides, la apigenina es el compuesto más estudiado y está presente en muy pequeñas cantidades como apigenina libre, pero sobre todo existe en forma de glucósidos diferentes (Srivastava y col., 2010). La manzanilla, además, contiene cumarinas, aceites esenciales y camazuleno conociendo que las cumarinas y los flavonoides son solubles en agua caliente. (Rodríguez-Fragoso y col., 2008).

De acuerdo a lo reportado en la bibliografía se sabe que estos compuestos presentan actividad supresora de daño oxidativo en membranas, proteínas y ADN al inhibir la actividad de radicales libres y contribuyen a la protección contra trastornos crónicos de salud como la aterosclerosis e hipertensión (Kato y col., 2008).

II.5.2.3 Infusión de hierbabuena (*Mentha piperita*)

Mentha piperita es una de las plantas comúnmente usadas en el tratamiento de la gripe, bronquitis, fiebre, náuseas, vómitos presentando actividad antimicrobiana y antioxidante (Barbalho y col., 2009), sin embargo no es conocido su consumo para el tratamiento de dislipidemias.

Ésta planta se consume normalmente en forma de infusión sin embargo se han observado algunos efectos benéficos (reducción significativa de los triacilgliceroles y aumento de HDL-c) con el consumo del jugo de las hojas. Existen también estudios donde se muestra que la administración de *Mentha piperita* como tratamiento genera una reducción en la ganancia de peso en ratas Wistar (Barbalho y col., 2009).

Cabe resaltar que muchos estudios se han llevado a cabo para investigar los beneficios para la salud de varias especies de *Mentha* y son los compuestos fenólicos los responsables al menos de los efectos antioxidantes y antiperoxidantes de éstas (Ka y col., 2005) gracias a que presentan actividad en el arresto de radicales lo cual también se asocia asociado al contenido de terpenoides y otros componentes y no solo compuestos fenólicos como los flavonoides. También se ha sugerido que compuestos como el carveol pueden permanecer acomplejado con metales de transición, que contribuyen a las propiedades de arresto de radicales (Samarth y col., 2006).

Además, se han identificado componentes como acetaldehído, alcohol amílico, ésteres de mentilo, limoneno, pineno, felandreno, cadineno y el sulfuro de

dimetilo. Dentro de los componentes más estudiados se encuentran el alfa-pineno, sabineno, terpinoleno, ocimeno, gamma-terpineno y otros (Rodríguez-Fragoso y col., 2009).

II.5.2.4 Infusión de toronja (*Citrus paradise*)

La infusión de toronja es una bebida preparada a partir del fruto seco o liofilizado colocado en el agua en ebullición. Dentro de los componentes principales encontrados en la toronja están la naringenina, la cual es una aglicona de la naringina, siendo de los flavonoides más abundantes encontrado en la toronja. La naringenina, que es responsable del sabor amargo del fruto, ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Estudios *in vivo* han demostrado que la naringenina reduce los niveles circulantes de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un 17 % en pacientes con hipercolesterolemia (Goldwasser y col., 2010).

De igual forma se ha encontrado otro compuesto principal denominado Nootkatona responsable también de algunos de los efectos de la toronja sobre la disminución del peso corporal. Ésta genera la activación de la protein cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) *in vivo* e *in vitro* generando la oxidación de ácidos grasos ya que al inducir la fosforilación de la protein cinasa (AMPK) y de la Acetil-CoA carboxilasa (ACC) generando una disminución en el peso corporal de ratones. Además ha mostrado tener la capacidad de atenuar el aumento de leptina en plasma (Murase y col., 2010).

II.5.2.5 Infusión de alcachofa (*Cynara scolymus*)

Los principales constituyentes de los extractos de alcachofa son ácidos hidroxicinámicos como el ácido clorogénico, cafeico, ferúlico y flavonoides tales como luteolina y glucósidos de apigenina (Azzini y col., 2007).

Respecto a la información relacionada con las propiedades de la alcachofa, se ha demostrado el efecto antioxidante y protector de la alcachofa en cultivos primarios de hepatocitos de rata. El ácido clorogénico y la cinarina representan una parte del principio antioxidante de los extractos (Gebhardt, 1997).

También se ha reportado la capacidad de estos extractos para reducir los niveles de lípidos plasmáticos, incluyendo el colesterol total (Bundy y col., 2008) y se ha observado la capacidad de estos extractos de hojas de alcachofa para inhibición la oxidación de LDL (Wider y col., 2009).

Con base en lo anterior se ha demostrado que las infusiones tienen la capacidad de disminuir estados oxidantes y de inflamación, así como algunas alteraciones relacionadas con la obesidad, la cual es considerada un estado inflamatorio crónico. Sin embargo se tiene poca información respecto al efecto de las infusiones sobre la ganancia de peso y grasa visceral que se genera durante la obesidad, así como, sobre las patologías secundarias generadas como consecuencia del estado de obesidad como lo es el daño renal.

IV. HIPÓTESIS

Las infusiones utilizadas en el estudio controlan el desarrollo de las alteraciones renales en procesos inflamatorios crónicos como la obesidad debido a su capacidad antiobesigénica y antioxidante, lo cual, podría tener beneficios disminuyendo la generación de patologías secundarias durante la obesidad.

V. OBJETIVOS

V.1 General

Determinar el efecto del consumo de las infusiones al 1% sobre las alteraciones renales inducidas por una dieta alta en grasa saturada y fructosa en ratas Sprague-Dawley.

V.2 Específicos

- Determinar la concentración del contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de las diferentes infusiones utilizadas.
- Evaluar el efecto del consumo de las infusiones al 1% sobre la reducción de parámetros de obesidad en ratas Sprague Dawley obesas.
- Estudiar la capacidad de las infusiones para regular parámetros relacionados con el estrés oxidativo en el riñón de ratas obesas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Materiales

VI.1.1 Infusiones utilizadas

Se utilizaron 3 diferentes infusiones de las siguientes marcas comerciales: manzanilla (*Matricaria recutita*) de la marca Lagg's, té verde (*Camellia sinensis*) de la marca Lagg's y hierbabuena (*Menta piperita*) de la marca Therbal. Las infusiones de alcachofa (*Cynara scolymus*) y toronja (*Citrus Paradise*) se prepararon a partir de frutos previamente liofilizados.

Las infusiones se prepararon adicionando 100 mL de agua destilada en un matraz, el cual se calentó hasta ebullición, se retiró y se agregó 1 g de la hoja o fruto seco para posteriormente dejar reposar por 15 minutos, se filtró usando un papel filtro Whatman No. 4 y se dejó enfriar.

VI.1.2 Material biológico utilizado

Se utilizaron 63 ratas macho Sprague-Dawley provenientes de Rismart S.A de C.V., de seis semanas de edad, con un peso promedio de 250 g. Se colocaron en un bioterio acondicionado, manteniéndolas con periodos de luz y oscuridad de 12 hr durante la fase experimental con acceso *ad libitum* al agua y alimento.

VI.1.3 Dieta

La dieta administrada a los animales consistió en una proporción alta en carbohidratos simples (fructosa) y grasa saturada. El contenido calórico de la dieta fué de un total de 433.53 Kcal. La dieta se preparó de la siguiente manera: 50 % de alimento base al cual se le adicionó 5.7 % de manteca de cerdo, 8 % de aceite de coco, 10.8 % de caseína, 23 % de fructosa, 0.7 % de vitaminas y 1.8 % de minerales obteniéndose el siguiente contenido nutrimental: 18.2 % de

proteínas, 47.1 % de carbohidratos y 34.7 % de lípidos (20.8 % saturados, 7.7 % monoinsaturados y 4.5 % poli insaturados).

El alimento base utilizado (croqueta comercial para rata marca Harlan Teklad LM-485) se molió y posteriormente se mezcló con cada uno de los ingredientes mencionados en la dieta final.

Para el grupo control sano se administró una dieta de alimento base (molido) solamente, el cual contenía un porcentaje de 19.92 % de proteína, 5.67 % de grasa y 4.37 % de fibra con un contenido calórico de 342.9 Kcal.

VI.2 Métodos

VI.2.1 Determinaciones a las infusiones

VI.2.1.1 Determinación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu

En un vial de vidrio se adicionaron 20 μL de cada una de las infusiones, se completó a 250 μL con agua destilada, posteriormente se adicionaron 125 μL del reactivo de Folin (1 N) y se agitaron con vortex por 5 minutos. Enseguida se agregaron 625 μL de Na_2CO_3 al 20 % y se dejaron reposar durante 2 horas en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se cargaron 300 μL de cada uno de los tubos en un lector de microplaca modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) y se leyeron en un espectrofotómetro a 760 nm. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra.

VI.2.1.2 Determinación flavonoides totales

De cada una de las infusiones se colocaron 50 μL en una microplaca de ELISA, seguido de la adición de 180 μL de agua destilada y finalmente se adicionaron 20 μL de la solución 2-aminoetildifenilborato al 1 %. Inmediatamente después,

las muestras se leyeron en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 404 nm. Los resultados se expresan como mg equivalentes de rutina por g de muestra.

VI.2.1.3 Determinación de taninos condensados

De cada una de las infusiones se agregaron 50 μ L en una microplaca de ELISA, posteriormente se adicionaron 200 μ L de una solución 1:1 de (+) catequina (HCL al 8 %: vainillina al 1 %) para preparar el blanco se adicionaron 50 μ L de agua destilada y 200 μ L de HCL al 4 %. Finalmente, las muestras se leyeron en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) entre 492-540 nm de absorbancia.

VI.2.1.4 Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó el método de ABTS, con el cual es posible evaluar cuantitativamente la capacidad de los compuestos de eliminar radicales como el ABTS. Se preparó una solución con 5 mL del radical ABTS (7mM) y 88 μ L de persulfato de potasio (140 mM). Ésta se almacenó en refrigeración (protegida de la luz) por 12 hr hasta su uso. Se mezclaron 500 μ L de la solución concentrada de ABTS con 20-25 mL de etanol para obtener una absorbancia de la dilución de 0.7 ± 0.2 a una longitud de onda de 734 nm en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Para el blanco se adicionaron 230 μ L de etanol + 20 μ L de agua destilada, como control 230 μ L de ABTS + 20 μ L de agua destilada y para las muestras se colocaron 230 μ L de ABTS + 20 μ L de la muestra. Las absorbancias se midieron al minuto cero y a los 6 minutos a 734 nm. Los resultados son expresados como la concentración media necesaria para generar la inhibición del radical (IC50) en unidades de mg/g.

VI.2.1.5 Determinación de la oxidación de LDL *in vitro*

Se obtiene la fracción de LDL a partir de suero utilizando el reactivo precipitante siguiendo la metodología marcada en el kit (Lincon Laboratorios).

Para el ensayo, se colocaron 200µL de LDL precipitada en tubos cónicos, 100µL de CuSO₄ 5mM, para completar el volumen a 1 mL con amortiguador de fosfatos pH 7.4. Se incubaron a 37° C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó 1 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0.37 % y 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0.15 %. Se colocaron a ebullición durante 20 minutos y para posteriormente finalizar la reacción se adicionó a cada tubo 2 mL de butanol, se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se tomó la fase superior y se leyó en un espectrofotómetro a 532 nm. Los resultados se expresaron de acuerdo al porcentaje de inhibición que se calculó de la siguiente forma:

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

VI.2.1.6 Determinación de la oxidación de proteína *in vitro*

Uno de los métodos para la detección de grupos carbonilos se realiza a través de su reacción con DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazina) seguido de la cuantificación espectrofotométrica de las hidrazonas ácidas formadas a 370 nm. Se colocó en un tubo cónico la dilución correspondiente de infusión de acuerdo las concentraciones a manejar, 80 µL de albúmina, 80µL de FeCl₃ 250 mM y 2 µL de H₂O₂ al 30 %. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionaron 200 µL de DNPH 10 mM en HCl 2M y se agitó e incubó 1 hora a 37°C. Después se agregó a cada tubo 325 µL de TCA al 50 % y se incubaron a 4°C por 10 minutos. Se centrifugaron a 3000 gravedades (g) por 10 minutos. En el siguiente punto se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla formada 3 veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y se centrifugaron los tubos entre cada

lavado a 11000 g por 3 minutos. Después del último lavado se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el solvente del precipitado. Se disolvió éste en 1 mL de solución de guanidina 6M resuspendida en amortiguador de fosfato de potasio 25 mM pH 6.5 (ajustado con ácido trifluoroacético 0.1 %) y se incubó a 37°C por 15 minutos. Finalmente se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C y se leyó la fase superior a 370 nm utilizando guanidina como blanco. Los resultados se expresaron en mg de restos de carbonilo/g de infusión.

VI.2.2 Estudios *in vivo*

VI.2.2.1 Tratamiento

Se formaron 7 grupos experimentales los cuales consistieron en un grupo como control negativo (dieta estándar), otro como control de obesidad, y los grupos bajo tratamiento; té verde, manzanilla, hierbabuena, alcachofa y toronja. El control de obesidad y los tratamientos se alimentaron con una dieta alta en grasa. El tratamiento con las infusiones en lugar de agua inició de manera conjunta con la dieta alta en grasa. El experimento se llevó a cabo durante 12 semanas. Transcurridas éstas se sacrificaron los animales.

VI.2.2.2 Mediciones semanales

Se monitoreó el peso corporal y crecimiento para cada una de las ratas, tomando como referencia la longitud, desde la nariz al ano. Con estos datos se determinó el índice de masa corporal.

VI.2.3 Sacrificio

Previo al sacrificio, los animales se mantuvieron en ayuno de 12 horas. Durante el sacrificio se llevó a cabo la recolección de orina y de igual forma se colectó una muestra de sangre por punción cardiaca, se centrifugó por 10 minutos separando el suero el cual se almacenó en tubos Eppendorf.

De igual forma se extrajeron diferentes tejidos y órganos tales como: tejido adiposo visceral, hígado, músculo y riñón. Éstos se lavaron inmediatamente con solución fisiológica y se congelaron en nitrógeno líquido, para después almacenarse a -70°C hasta su posterior uso.

VI.2.4 Determinaciones en muestras biológicas

VI.2.4.1 Determinación del efecto de las infusiones sobre el modelo de obesidad inducida

VI.2.4.1.1 Peso corporal e índice de masa corporal (IMC)

Se realizó la medida del peso corporal y se calculó con este dato el Índice de Masa Corporal (IMC) para evaluar el peso corporal con respecto a su estatura, para lo cual se midió el peso de cada animal en kilogramos y la distancia naso-anal en metros. Los cálculos se realizaron en base a la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso corporal (kg)} / \text{distancia naso-anal (m)}^2$$

VI.2.4.1.2 Perfil de lípidos

En el suero colectado se midieron los niveles sanguíneos de triglicéridos, colesterol LDL, colesterol HDL y colesterol total, utilizando kits enzimáticos Lipid Profile (marca RANDOX Laboratories LTD).

VI.2.4.1.3 Determinación de triglicéridos en tejido adiposo

Para la extracción de los triglicéridos del tejido adiposo se utilizó el método de Folch (1957). Se tomó aproximadamente 0.5 g de tejido y se homogenizó mediante un pistilo con un pequeño volumen de mezcla de solvente (cloroformo: metanol 2:1), luego se llevó hasta un volumen de 7.5 mL con la misma mezcla. El tiempo de homogenización fue de 3 minutos. Posteriormente, la muestra se pasó a un tubo Falcon provisto de un embudo con papel filtro. Se

filtró y enjuagó con 2 mL de la mezcla de solventes. Se midió el volumen del extracto crudo total y se le adicionó un quinto del volumen de FSSPSS (cloroformo: metanol: agua, 3:48:47 con 0.02 % de CaCl₂). Se homogenizó con una varilla de vidrio, la cual se lavó con 0.25 mL de FISP (cloroformo: metanol: agua, 86:14:1). Se dejó reposar y se retiró la fase superior mediante una pipeta Pasteur. La fase inferior se lavó 3 veces con 0.75 mL con FSSP (cloroformo: metanol: agua, 3:48:47). A la fase inferior se le adicionaron 0.25 mL de metanol, se homogenizó y se lavó el tubo y la varilla de vidrio con 0.5 mL de cloroformo y finalmente se homogenizó nuevamente. Para la determinación de triglicéridos se utilizó un kit enzimático Lipid Profile, de la marca RANDOX Laboratories LTD. El contenido de triglicéridos en el tejido adiposo se expresó como mg/g de tejido.

VI.2.4.1.4 Determinación de triglicéridos en hígado

Para esta determinación se tomaron 100 mg de tejido hepático y se adicionó 1 mL de una solución 2:1 de KOH al 30% y etanol absoluto para posteriormente ser homogenizado en un Polytron (Kinematica, Suiza). Las muestras homogenizadas se incubaron por un mínimo de 12 hr a 55°C en agitación. Pasado el tiempo de incubación se les adicionó un volumen de una solución 1:1 de etanol y agua destilada para centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se agregó un volumen de una solución 1M de MgCl₂ y se incubaron por 10 minutos en hielo. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se determinó el contenido de triglicéridos mediante el kit enzimático Lipid Profile (marca RANDOX Laboratories LTD). El contenido de triglicéridos en el hígado se expresó como mg/g de tejido.

VI.2.4.2 Determinación del efecto del consumo de infusiones sobre parámetros relacionados con alteraciones renales.

VI.2.4.2.1 Determinación de proteína en orina

Para la cuantificación de proteína en orina se utilizó el método de Bradford. El ensayo está basado en la unión a la proteína (a la máxima absorbancia, 465-595 nm) de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G 250. Las interacciones hidrófobas, al igual que las iónicas, estabilizan la forma aniónica del tinte, causando un cambio visible en color. Para realizarla se procedió a realizar la curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA), con la cual posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras. Se colocaron 50 μ L de la muestra en una microplaca, se le adicionó 200 μ L del reactivo de Coomassie y se leyó a 595 nm en un lector de ELISA modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

VI.2.4.2.2 Determinación de creatinina

La determinación de creatinina se realizó en orina y suero, empleando un kit Randox el cual se basa en el principio de que la creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo coloreado. La cantidad del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina. La determinación en suero se realizó directamente sin dilución y para el caso de la orina se diluyó 1:49 con agua destilada. El reactivo de trabajo se preparó mezclando volúmenes iguales de las soluciones R1a y R1b que contiene el kit. Para llevar a cabo el ensayo se colocó en una celda de cuarzo de 1 mL el reactivo de trabajo preparado y 0.1 mL de la muestra, se mezcló por inversión y se leyó la absorbancia inicial al cabo de 30 segundos a 492 nm y exactamente 2 minutos después la absorbancia final. La concentración que se consideró de acuerdo al kit para el patrón fue de 2 mg/dL para el suero y 100 mg/dL para la orina. Los resultados fueron calculados con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Creatinina} = \frac{\Delta \text{ Abs Muestra}}{\Delta \text{ Abs Patrón}} \times \text{concentración patrón}$$

VI.2.4.2.3 Determinación de urea

El ensayo para la determinación de urea se llevó a cabo en suero y en orina empleando un kit de la compañía Randox, el cual se basa en el principio de hidrólisis de la urea en presencia de agua y ureasa para producir amoníaco y dióxido de carbono. Para el ensayo se mezclaron las soluciones R1a y R1b que contiene el kit, mezclando todo el volumen para tener el reactivo de trabajo. Después se adicionó 1 mL del reactivo de trabajo en una celda de cuarzo y 10 μ L de la muestra (suero, orina ó patrón). Se mezclaron por inversión y se leyó la absorbancia inicial a los 30 segundos a 340 nm y exactamente 1 minuto después se leyó la absorbancia final. Los resultados se expresan como mg/dL en el caso del suero y mg/24 horas en el caso de la orina. La concentración que se consideró de acuerdo al kit para el patrón fue 80 mg/dL. Los resultados se calcularón con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Urea} = \frac{\Delta \text{ Abs Muestra}}{\Delta \text{ Abs Patrón}} \times \text{concentración patrón}$$

VI.2.4.2.4 Determinación de enzimas antioxidantes

VI.2.4.2.4.1 Preparación de citosoles para catalasa

Se tomaron 0.5 g del tejido de riñón, el cual se homogenizó en un Polytron (Kinematica, Suiza), con 5 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7, que contenía EDTA 0.5 mM, Tritón 0.5 % y etanol 1 %. Después se centrifugaron a 800 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó en tubos Eppendorf a -70° C hasta su análisis.

VI.2.4.2.4.2 Determinación de la concentración de proteína en los citosoles

La cuantificación de proteína presente en los citosoles se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA), empleando un kit de la marca Pierce.

Las diluciones de citosoles fueron 1:50 para un volumen final de 200 μL . Para el ensayo se tomaron 50 μL de la dilución de las muestras de citosoles en una placa de 96 pozos y se adicionaron 250 μL de la solución de trabajo (50 partes del reactivo A + 1 Parte del reactivo B). Se incubaron por 30 minutos a 30°C. Posteriormente se leyeron a 563 nm en un lector de ELISA modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). La curva estándar se realizó empleando la proteína albúmina sérica bovina.

VI.2.4.2.4.3 Determinación de la actividad de la catalasa

Para el ensayo se prepararon las soluciones de peróxido de hidrógeno (10 mM y 20 mM) para lo cual se diluyeron 20 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en un 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7). Para determinar la concentración de la dilución y obtener la molaridad deseada, se leyó a 240 nm calculando la concentración actual de peróxido de hidrógeno con la siguiente fórmula:

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ (mM)} = (A_{240}) / (0.0436)$$

Después se procedió a realizar la curva estándar, preparando una serie de soluciones de H_2O_2 10 mM : 0, 125, 250, 500 y 750 μL aforando a un volumen final de 1 mL con la solución amortiguadora de ensayo (solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7).

Para llevar a cabo la reacción de catalasa, se preparó una dilución 1:50 para un volumen total de 500 μL de los homogenados citosólicos preparados

previamente en solución amortiguadora de ensayo. A las muestras se les adiciono 500 μL de H_2O_2 20 mM. A los 3 segundos, las muestras se midieron a 240 nm y después en intervalos de 5 segundos durante 30 segundos para un total de 7 lecturas en la cinética. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

VI.2.4.2.4.4 Preparación de citosoles para glutatión reducido (GSH) y glutatión S-transferasa (GST)

Para preparar los homogenados citosólicos se pesaron 0.5 g de riñón en un tubo cónico, se adicionaron 3 mL de solución amortiguadora Tris/Sacarosa, pH 7 y se homogenizaron con un Polytron (Kinematica, Suiza). Después se centrifugaron a 8000 g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y transfirió a una celda de ultracentrífuga (Beckman Optima L90K), y se centrifugaron a 100,000 g durante 1 hora. Se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf y los citosoles finales se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

VI.2.4.2.4.5 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH)

La determinación de la concentración se basa en la reducción del ácido 5,5-ditiobis dinitro benzoico (DNTB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) por el grupo SH.

Para la curva estándar, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: solución amortiguadora TRIS-EDTA (Tris 0.2 M, EDTA 0.02 M, pH 8.2), solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH, metanol y solución de DNTB (ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, 2.46 mM). Las soluciones se incubaron durante 5 minutos y se leyeron a 412 nm en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Para las muestras se utilizaron los citosoles previamente preparados. A estos se les precipitó la proteína de acuerdo a la siguiente metodología: Se adicionaron 120 μL de agua destilada en un tubo Eppendorf, 150 μL de citosol concentrado y 30 μL de TCA al 20 %, se dejaron reposar por 30 minutos a 4°C, para posteriormente centrifugarse a 8000 g por 5 minutos a 4°C y recuperar el sobrenadante. De éste se tomaron 50 μL y se colocaron en una placa de 96 pozos, se adicionaron 150 μL de solución amortiguadora TRIS-EDTA, 80 μL de metanol y 20 μL de DNTB, se incubaron durante 5 minutos y finalmente se leyeron a 412 nm en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Los resultados se expresaron como μg de GSH/ mg de proteína.

VI.2.4.2.4.6 Determinación de la actividad glutatión S-transferasa (GST)

Para realizar esta determinación se utilizó el método basado en la reacción catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro,2,4-dinitrobenceno).

Para el ensayo, se tomaron 50 μL de los citosoles previamente preparados, se colocaron en una placa de 96 pozos, se adicionó 100 μL de la solución de trabajo de GSH 3 mM y 150 μL de la solución de trabajo CDNB 2 mM. La placa se leyó inmediatamente a 340 nm (25°C) durante 2 minutos, con periodos de 20 segundos. Los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína*min.

VI.2.4.2.5 Determinación de la peroxidación lipídica en riñón

Este ensayo se utiliza para determinar el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según lo descrito por Ohkawa y col. (1979).

Dentro del procedimiento se tomaron 100 mg de tejido en un tubo Eppendorf y se les adicionó 1.2 mL del amortiguador de fosfatos con KCl (1.17 %), pH 7.4,

0.01 M. El tejido se homogenizó y se centrifugó a 1600 rpm durante 5 minutos a 4° C. Una vez recuperado el sobrenadante, se centrifugó nuevamente a 10,500 g durante 20 minutos a 4° C. Del sobrenadante se tomaron 850 µL en un tubo cónico y se agregaron 150 µL del amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.4. Después se adicionó 1 mL de TBA 0.67 % y 1 mL de TCA al 10 %, se agitaron en vortex y se colocaron en agua en ebullición durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se colocaron en hielo para detener la reacción. Finalmente se agregó 2.5 mL de butanol y se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos. Se tomó la fase superior la cual se leyó a 532 nm tomando como blanco el butanol. Los resultados se expresaron como nmol /mg de tejido.

VI.2.4.2.6 Cuantificación de proteínas en músculo

Para realizar la determinación de proteína en músculo se pesó 100 mg de tejido muscular, el cual se homogenizó en una solución de extracción de proteínas (2mL) utilizando un Polytron (Kinematica, Suiza). El homogenado se incubó por 45 minutos a 4°C con agitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13500 rpm durante 30 minutos. Finalmente, se recuperó el sobrenadante al cual se le determinó proteína mediante el método de Bradford.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se calcularon las medias \pm desviación estándar, y éstas se utilizaron para realizar un análisis de varianza (ANOVA) y obtener así diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente se realizó una comparación de todas las medias por el método de Tukey con valor significativo de $p < 0.05$. Para realizar las pruebas estadísticas se utilizó el software estadístico JMP versión 5.0.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VIII.1. Composición de compuestos fenólicos totales en las infusiones herbales estudiadas.

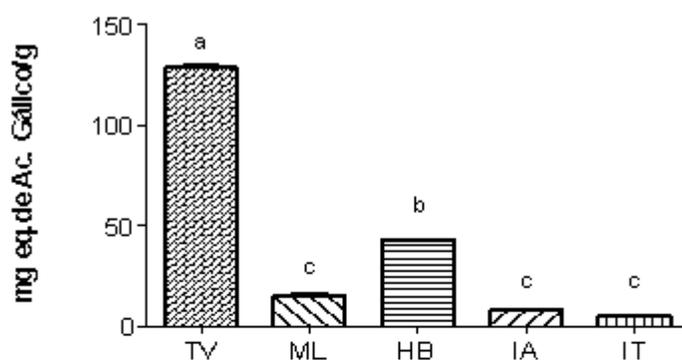
Las plantas herbales son una fuente importante de sustancias benéficamente activas para el cuerpo humano. Estas sustancias incluyen, entre otras, flavonoides, ácidos fenólicos y sus derivados taninos, además de aceites esenciales y vitaminas (Rusaczonек y col., 2007).

Por esta razón fue importante determinar la concentración de estos compuestos fenólicos en las infusiones herbales estudiadas para analizar su posterior efecto. En la figura 4 se muestran los resultados de la concentración total de fenoles, flavonoides y taninos en las infusiones estudiadas. Respecto al contenido de fenoles, el té verde fue la infusión que presentó mayor concentración con 127.54 mg eq. de ácido gálico/g, seguida de la infusión de hierbabuena con 43.14 mg eq. de ácido gálico/g y manzanilla con 15.43 mg eq. de ácido gálico/g. Esta misma tendencia fue reportada por Moraes (2008) quien encontró valores similares a los de este estudio con un valor aproximado de 17 mg eq. de ácido gálico/g para manzanilla y 34 mg eq. de ácido gálico/g aproximadamente para hierbabuena. De igual forma, Katalinic y col. (2006) reportaron mayor concentración de fenoles en la infusión de hierbabuena seguida de manzanilla.

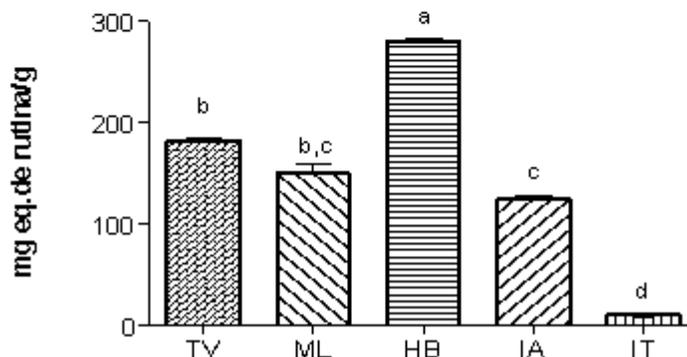
En el caso de las infusiones de alcachofa y toronja se observó una concentración muy baja de fenoles (9.96 mg eq. de ácido gálico/g y 5.49 mg eq. de ácido gálico/g, respectivamente). Gião y col. (2007) reportan valores de 0.220 ± 0.003 g eq. de ácido gálico/L para la infusión preparada a partir de polvo de alcachofa, 0.160 ± 0.073 g eq. de ácido gálico/L para una infusión preparada calentando el agua y después adicionando las hojas y 0.205 ± 0.014 g eq. de ácido gálico/L para una infusión preparada al hervir el agua junto con las hojas, que considerando las condiciones en que se prepararon las

infusiones (1 g/110 mL) del estudio de Gião y col., los resultados se pueden expresar en mg eq. de ácido gálico/g lo que equivale a 24.20, 17.60 y 22.55 eq. de ácido gálico/g respectivamente. Estos resultados muestran una mayor concentración respecto al resultado obtenido en nuestro ensayo, con lo cual podemos inferir que diversos factores pueden afectar el contenido de fenoles totales encontrados en las infusiones tal es el caso de alcachofa en el cual podría influir la variedad del material vegetal, las condiciones climáticas, así como la preparación de las infusiones. Sin embargo, es importante destacar que los valores obtenidos de fenoles totales son bajos respecto al té verde.

a) Concentración de fenoles totales



b) Concentración de flavonoides



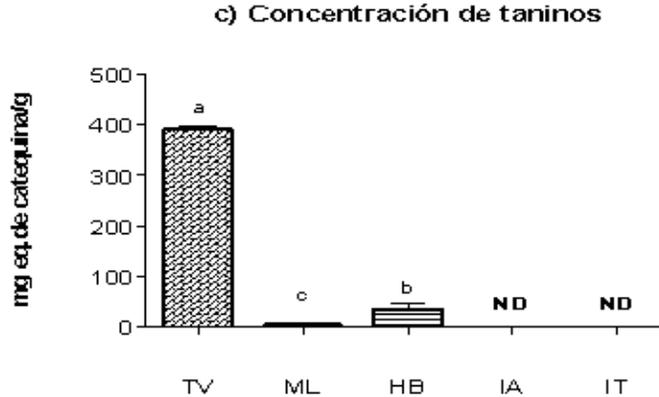


Figura 4. Concentración de fenoles totales (a), flavonoides (b) y taninos (c) en las infusiones estudiadas. TV (Té verde marca Lagg's); ML (Manzanilla marca Lagg's); HB (Hierbabuena marca Therbal); IA (Infusión de alcachofa); IT (Infusión de toronja). Los valores representan la media \pm E.E. Las siglas ND representan No Detectado. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre infusiones ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

Respecto al valor obtenido en flavonoides y taninos se puede observar que el tipo predominante de fenoles en la infusión de manzanilla son los flavonoides (150.46 ± 8.70 mg eq. de rutina/g), comparado con su contenido de taninos (3.007 ± 0.002 mg eq. de catequina/g), valores que concuerdan con lo publicado por Pizarro y col. (1994) quienes reportan un bajo contenido de taninos en la infusión de manzanilla (< 10 mg de ácido tánico/g) atribuyendo el resto del contenido fenólico a los flavonoides, que a pesar de ser un estándar diferente se sigue la misma tendencia.

Respecto a la infusión de alcachofa se puede observar el mismo patrón que en la infusión de manzanilla, el contenido de flavonoides (125.46 ± 2.76 mg eq. de rutina/g) es elevado respecto a los taninos, los cuales no lograron ser detectados con el ensayo utilizado. Estos datos concuerdan con información previa, tal como lo mencionan Mulinacci y col. (2004) y Wang y col. (2003), resaltando el hecho de que los compuestos fenólicos encontrados en las hojas y cabeza de alcachofa son en su mayoría flavonoides, documentados como los principios activos de la alcachofa.

VIII.2. Capacidad antioxidante de las infusiones herbales estudiadas.

Seguido a la cuantificación de fenoles, flavonoides y taninos presentes se realizaron determinaciones *in vitro* para observar el efecto del contenido de éstos en la actividad antioxidante de las infusiones estudiadas (Figura 5). Se sabe que cuando la generación de radicales libres o especies reactivas del oxígeno, durante el metabolismo y otras actividades, superan la capacidad antioxidante de un sistema biológico se genera el estrés oxidativo. Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en bajas concentraciones comparados con el sustrato oxidable, retrasan significativamente o evitan la oxidación de dicha sustancia, siendo las plantas una fuente potencial de antioxidantes naturales (Ghasemzadeh y col., 2010).

Por esta razón para analizar la capacidad antioxidante de las infusiones en este estudio se realizaron tres técnicas, (ensayo del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}), inhibición de la oxidación de LDL e inhibición en la oxidación de proteínas) en las cuales se determinó la concentración mínima necesaria para inhibir el 50 % de la oxidación (IC50). En la figura 5 se puede observar que la infusión con los mejores resultados fue el té verde. Este efecto puede ser atribuido a las catequinas presentes en el té verde ya que se sabe que la epicatequina y la epigallocatequina presentes en el té verde, inhiben la oxidación de LDL *in vitro* (Yamanaka y col., 1997; Gomikawa e Ishikawa, 2002). Se sugiere que este efecto generado por las catequinas se debe a la capacidad que tienen de quelar iones metálicos además de capturar radicales libres evitando con ello reacciones de oxidación.

Para el caso de las infusiones de manzanilla y hierbabuena presentaron un comportamiento similar en el ensayo del radical ABTS y en la inhibición de la oxidación de proteína *in vitro*, presentando valores similares sin diferencia significativa entre ambos. Sin embargo, en el caso del ensayo de la inhibición de la oxidación de LDL la concentración inhibitoria media para el caso de hierbabuena fue menor respecto a manzanilla, siendo incluso estadísticamente

igual a la presentada por el té verde, con valores de 0.164 ± 0.001 y 0.644 ± 0.017 mg/g para hierbabuena. Esto concuerda con el orden observado en la concentración de fenoles totales, flavonoides y taninos donde el té verde fue el de mejores resultados, seguido de hierbabuena y finalmente manzanilla. La composición fenólica puede explicar, en parte, la actividad antioxidante que se encuentra para estas plantas. Los resultados reportados por Ozgen y col. (2006) indican que los compuestos fenólicos del género *Mentha* actúan como antioxidantes primarios que pueden reaccionar con los radicales libres y limitar el ataque de especies reactivas de oxígeno.

Para el caso de las infusiones de alcachofa y toronja, éstas mostraron concentraciones inhibitorias medias altas (para las tres técnicas) respecto a las demás infusiones (té verde, manzanilla y hierbabuena). Esto podría explicarse por los bajos niveles de fenoles totales ó un mecanismo de acción diferente al arresto de radicales. Aunado a esto, la estructura química de los compuestos fenolicos también afecta la actividad antioxidante en las infusiones. La particularidad de la posición y cantidad de un grupo hidroxilo sobre el anillo B en la molécula de los compuestos flavonoides influye sobre la actividad antioxidante, tal es el caso de la naringenina y hesperidina (Karakaya y col., 2006), encontradas precisamente en la toronja, que tiene sólo un grupo hidroxilo, lo cual hace que su actividad antioxidante sea baja. Esto podría explicar los resultados encontrados *in vitro* para esta infusión, ya que para los ensayos de ABTS, LDL oxidada y oxidación de proteína *in vitro*, se necesitan 1033.93 ± 41.97 mg/g, 513.2 ± 3.79 mg/g, 14.32 ± 0.012 mg/g de concentración inhibitoria media respectivamente.

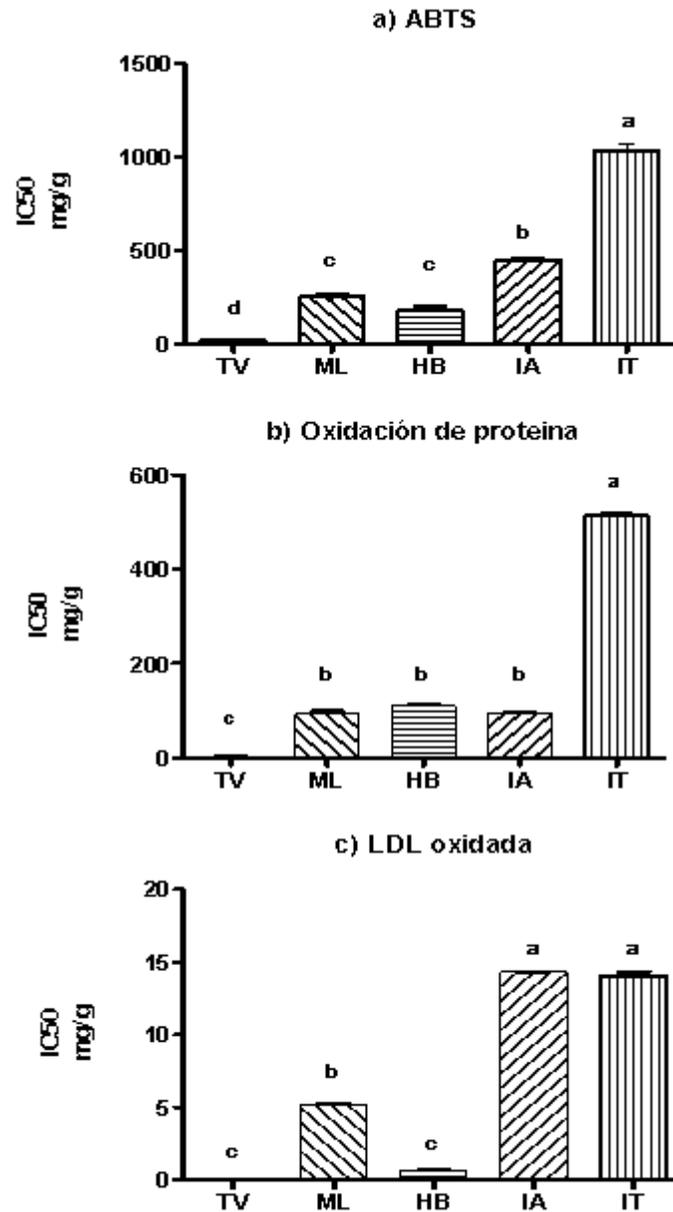


Figura 5. Capacidad antioxidante *in vitro* reportado como la concentración inhibitoria media para los ensayos de ABTS (a), oxidación de proteína (b) y LDL oxidada (c) para cada una de las infusiones estudiadas. TV (Té verde marca Lagg's); ML (Manzanilla marca Lagg's); HB (Hierbabuena marca Therbal); IA (Infusión de alcachofa); IT (Infusión de toronja). Los valores representan la media \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre infusiones ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

VIII.3.-Efecto de las infusiones estudiadas sobre el modelo de obesidad inducida.

Conociendo la capacidad antioxidante que tienen los componentes fenólicos de las infusiones, se analizó el efecto de éstas sobre el modelo de obesidad.

La obesidad es un problema creciente, causando cada vez más mortalidad y morbilidad, existiendo una alta demanda para su tratamiento; sin embargo, la eficacia de terapias convencionales es limitada, lo cual ha favorecido el consumo de productos alternativos (Lira-García y col., 2008). Tal es el caso del té verde, para el cual existen estudios en los cuales se ha utilizado para promover la termogénesis e incrementar la liberación de energía generando de manera implícita la pérdida de peso. El té verde ha sido la infusión más estudiada; sin embargo, existen otras posibilidades por indagar dentro de infusiones tales como toronja y alcachofa.

Respecto al peso se pudo observar (Cuadro 1) en los grupos que recibieron el té verde, la infusión de alcachofa y de toronja, niveles más bajos respecto al control obeso (514 ± 2.1 g), siendo estadísticamente significativos con valores de 452 ± 7.9 , 478 ± 8.4 y 480 ± 1.8 g, respectivamente, resaltando que el grupo que recibió el té verde reportó un peso promedio estadísticamente igual al control sano que presentó un valor de 455 ± 2.0 g. De igual forma, el índice de masa corporal fue menor para el grupo que recibió el té verde respecto al control obeso. Sin embargo, cabe resaltar que los mismos grupos que redujeron significativamente en peso corporal, también redujeron el índice de masa corporal (IMC), tal es el caso de los que recibieron las infusiones de alcachofa y toronja, que aunque estos valores no resultaron estadísticamente significativos, también son menores al control obeso con valores 6.57 ± 0.12 y 6.58 ± 0.03 g/cm², respectivamente. En base a los resultados anteriores cabe destacar el efecto de las infusiones de toronja y alcachofa para inhibir el incremento en el peso corporal. Este efecto generado por la infusión de toronja puede ser

atribuido a sus polifenoles, que a pesar de ser bajo el contenido detectado en este estudio se sabe que la actividad y efecto de estos no depende de la cantidad, ya que Rastmanesh (2011) sugiere que el consumo diario de toronja genera una reducción del peso corporal en individuos con obesidad gracias al efecto de sus polifenoles los cuales no permiten que exista un desequilibrio en la flora bacteriana en el intestino evitando con ello la expresión de genes que promueven la obesidad además se ha demostrado que polifenoles de la toronja en conjunto con otros de origen cítrico tienen la capacidad de inhibir la fosfodiesterasa del adenosin monofosfato cíclico ó AMPc de acuerdo con Dallas y col. (2008), aumentando los niveles de AMPc y con ello la lipólisis.

Cuadro 1. Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre el peso y el índice de masa corporal (IMC²) en un modelo de obesidad inducida en ratas Sprague-Dawley.

Tratamiento	Peso (g)	IMC (g/cm ²)
Sanas	455 ± 2.03 ^c	6.4 ± 0.19 ^c
Obesas	514 ± 2.14 ^a	7.1 ± 0.03 ^{ab}
Té verde	452 ± 7.90 ^c	6.5 ± 0.07 ^{bc}
Manzanilla	510 ± 2.92 ^{ab}	7.2 ± 0.15 ^a
Hierbabuena	511 ± 13.68 ^{ab}	7.0 ± 0.19 ^{abc}
Alcachofa	478 ± 8.43 ^{bc}	6.6 ± 0.12 ^{abc}
Toronja	480 ± 1.89 ^{bc}	6.6 ± 0.03 ^{abc}

Los valores representan la media ± E.E Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos (p<0.05), evaluado por la prueba de Tukey.

VIII.4.-Efecto de las infusiones estudiadas sobre el metabolismo de lípidos.

Además de evaluar el peso y el índice de masa corporal en los grupos de ratas que recibieron las diferentes infusiones, fue necesario analizar parámetros relacionados con el metabolismo de lípidos, lo anterior para saber el efecto de las infusiones sobre el modelo de obesidad ya que enfermedades metabólicas, como la obesidad, se relacionan con un estado de dislipidemia, caracterizado

por niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol y triglicéridos, así como niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Dentro del análisis que se realizó en el suero obtenido, en el cuadro 3 se muestra que respecto al colesterol HDL no hubo cambios significativos entre grupos; sin embargo, para el caso de LDL la infusión de toronja propicio que se evitara el aumento en este parámetro con un valor de 41.33 ± 4.57 mg/dL, respecto al obeso (59.49 ± 2.80 mg/dL), pese a la baja concentración de fenoles encontrados lo que sugiere que si el efecto es dado por los fenoles encontrados en la toronja, éste no tiene relación con la concentración siendo suficiente la mínima concentración para generar un efecto. Por ejemplo se ha observado que la naringina reduce los niveles de colesterol total a través de la inhibición de la enzima hepática 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMG-CoA) involucrada en la síntesis de colesterol y la enzima acil CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT). Ésta última es crítica para la síntesis de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en el hígado (Wilcox y col., 2001), lo cual se traduce en una menor síntesis de colesterol.

El resto de los grupos tratados con infusiones muestran niveles séricos de LDL más bajos que las ratas del grupo obeso y del sano aunque sin diferencia significativa, lo cual concuerda si se compara el valor de colesterol total donde de la misma forma menores niveles de colesterol total se observaron en general en los grupos, aunque en éste caso nuevamente la infusión de toronja evitó se llevara a cabo un incremento en los niveles de LDL en el grupo que recibió esta infusión existiendo una diferencia significativa respecto al obeso (58.62 ± 4.31 vs 79.81 ± 1.87 mg/dL, respectivamente) destacando también el efecto de la infusión de hierbabuena (61.72 ± 2.87 mg/dL), la cual, generó en el grupo que recibió esta infusión, niveles menores respecto al grupo obeso y sano al igual que los demás grupos que recibieron las infusiones de manzanilla, té verde y alcachofa, generando efectos positivos al mantenerse en parámetros iguales al

control sano y no permitiendo que la dieta influyera en el aumento de los niveles de triglicéridos y colesterol total como en el caso del control obeso.

Cuadro 2. Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre los niveles de colesterol total, HDL y LDL en suero de ratas Sprague-Dawley bajo un modelo de obesidad inducida.

Tratamiento	Colesterol HDL (mg/dL)	Colesterol LDL (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
Sanas	16.74 ± 0.63 ^a	52.27 ± 3.32 ^a	69.02 ± 2.98 ^{ab}
Obesas	19.11 ± 1.46 ^a	59.49 ± 2.80 ^a	79.81 ± 1.87 ^a
Té verde	17.46 ± 0.85 ^a	50.44 ± 6.37 ^a	68.12 ± 5.59 ^{ab}
Manzanilla	19.13 ± 1.06 ^a	46.07 ± 4.93 ^a	64.47 ± 5.48 ^{ab}
Hierbabuena	17.64 ± 1.05 ^a	44.76 ± 2.60 ^a	61.72 ± 2.87 ^{ab}
Alcachofa	17.95 ± 1.26 ^a	45.81 ± 1.54 ^a	67.50 ± 3.76 ^{ab}
Toronja	17.26 ± 0.31 ^a	41.33 ± 4.57 ^a	58.62 ± 4.31 ^b

Los valores representan la media ± E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

Aunado a estas determinaciones, se realizó la cuantificación de triglicéridos en suero, tejido adiposo e hígado (Cuadro 3). Respecto al nivel de triglicéridos en suero, se observa cómo los animales que recibieron las diferentes infusiones presentaron valores menores al grupo control obeso siendo significativas para manzanilla y hierbabuena. Para el caso del resto de los grupos, tratados con las diferentes infusiones, éstos presentaron valores menores al control obeso y estadísticamente iguales al sano, repitiéndose el mismo patrón para té verde en el caso del tejido adiposo presentando un valor de 141.24 ± 30.21 mg/g y presentando ahora, los grupos que recibieron la infusión de alcachofa y toronja, niveles de 144.21 ± 35.92 y 141.90 ± 31.79 mg/g respectivamente siendo significativamente igual que el control sano que presentó 151.19 ± 50.70 mg/g y menor al grupo obeso con un valor de 259.14 ± 34.97 .

Cuadro 3. Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre los niveles de triglicéridos en suero, tejido adiposo e hígado de ratas Sprague-Dawley en un modelo de obesidad inducida.

Tratamiento	Triglicéridos en suero (mg/dL)	Triglicéridos en tejido adiposo (mg/g)	Triglicéridos en hígado (mg/g)
Sanas	86.63 ± 6.25 ^{ab}	151.19 ± 50.70 ^b	25.72 ± 1.36 ^c
Obesas	131.69 ± 0.49 ^a	259.14 ± 34.97 ^a	34.26 ± 1.31 ^{ab}
Té verde	81.88 ± 13.67 ^{ab}	141.24 ± 30.21 ^b	26.05 ± 1.29 ^c
Manzanilla	71.14 ± 17.46 ^b	181.22 ± 42.49 ^{ab}	29.51 ± 1.32 ^{bc}
Hierbabuena	59.44 ± 1.66 ^b	181.05 ± 65.23 ^{ab}	39.24 ± 2.78 ^a
Alcachofa	98.01 ± 13.40 ^{ab}	144.21 ± 35.92 ^b	32.65 ± 1.88 ^{abc}
Toronja	102.03 ± 15.57 ^{ab}	141.90 ± 31.79 ^b	31.39 ± 2.35 ^{abc}

Los valores representan la media ± E.E Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

El mecanismo de reducción del almacenamiento de los triglicéridos tiene diversos orígenes, puede deberse tanto a la movilización de las grasas almacenadas, como a la disminución en la absorción de las mismas. Para el té verde se ha observado que las catequinas contenidas en éste inhiben la enzima lipasa pancreática (Koo y Hoh, 2007), presente en el intestino y encargada de hidrolizar las grasas promoviendo su absorción; por lo tanto, al inhibirse esta enzima, los lípidos provenientes de la alimentación no son absorbidos y, en consecuencia, no son almacenados en el tejido adiposo.

Respecto a la cuantificación en hígado, sólo el grupo que recibió té verde presentó niveles significativamente menores de triglicéridos respecto al grupo obeso. Con estos resultados podemos inferir que, para el caso de los grupos que recibieron las infusiones de alcachofa y toronja, así como hierbabuena, el efecto de presentar menores niveles de triglicéridos en el tejido adiposo está mediada posiblemente por la lipólisis y no alterando la lipogénesis en el hígado,

ya que en éste no se presentaron cambios significativos en los niveles de triglicéridos. Por otro lado, para los grupos tratados con las infusiones de manzanilla y té verde se muestra niveles hepáticos de triglicéridos más bajos, siendo significativa la disminución respecto al grupo obeso e incluso estadísticamente igual que el sano para el caso del té verde. Lo anterior sugiere que, el efecto de mantener bajos los niveles de triglicéridos en suero, podría estar deberse a la inhibición de la sintasa de ácidos grasos generando una disminución en la lipogénesis, ya que ciertos polifenoles y flavonoides del té fungen como inhibidores de esta enzima según lo reportado por Bing-Hui y col. (2005).

VIII.5.-Protección antioxidante en riñón de las infusiones estudiadas.

Durante la obesidad el estrés oxidativo genera daño en el organismo, debido a una inadecuada neutralización de los radicales libres por los sistemas antioxidantes, agravándose el daño cuando existe un decremento en la actividad de enzimas antioxidantes tales como la catalasa y glutatión S-transferasa. Estos radicales libres generan daño celular a través de la oxidación de lípidos de membrana y proteínas, lo cual puede determinarse en base a los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico que funcionan como marcadores del daño generado por las sustancias reactivas de oxígeno (Noeman y col., 2011).

Analizado el efecto sobre el modelo de obesidad y conociendo que una reducción drástica en el peso, puede disminuir el daño renal o incluso ser el tratamiento contra lesiones en este órgano (Serra y col., 2009), es necesario establecer la relación entre el efecto dentro de los parámetros de obesidad generados por las infusiones de estudio y su protección contra las alteraciones renales que pueden ser generadas.

Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo generado durante la obesidad afecta directamente al riñón se evaluó el efecto de las infusiones sobre la actividad

antioxidante *in vivo*. Se determinó la actividad de las enzimas catalasa y glutatión S-transferasa y la concentración de GSH en riñón (Cuadro 4), encontrando que el grupo que recibió la infusión de hierbabuena presento niveles mayores en la actividad de catalasa (123 ± 4 U/mg de proteína) y la concentración de GSH (19 ± 1 μ g de GSH/mg de proteína) respecto al control obeso, siendo los niveles de GSH estadísticamente significativos respecto al control obeso. De igual forma, el grupo perteneciente a la infusión de alcachofa mostró un aumento en la actividad de la catalasa y la concentración de GSH con valores de 125 ± 8 U/mg de proteína y 15 ± 1 μ g de GSH/mg de proteína respectivamente respecto al control obeso. El grupo que recibió el té verde reflejó un incremento significativo en la concentración de GSH respecto al control obeso y estadísticamente igual al control sano, siendo estas tres infusiones las que presentaron un cambio significativo en el sistema antioxidante del riñón.

Estos resultados permiten sugerir la relación con la actividad antioxidante encontrada *in vitro* para las infusiones, ya que el té verde fue el que presentó mejores resultados dando una concentración inhibitoria media menor al de las otras infusiones, seguida de hierbabuena. Al igual que *in vitro*, la actividad antioxidante *in vivo* para las dos infusiones (té verde y hierbabuena) fue mejor respecto a las demás. Estos resultados sugieren que el té verde y las infusiones de hierbabuena y alcachofa presentan mejor protección antioxidante para el riñón sobre las demás infusiones estudiadas, sin embargo a pesar de que el resto de las infusiones no modularon el estrés oxidativo tampoco lo aumentaron, lo cual indica que no causan efectos colaterales.

Cuadro 4. Efecto de las infusiones sobre el sistema antioxidante en riñón de ratas Sprague-Dawley con obesidad inducida.

Tratamiento	Actividad Catalasa (U/mg de proteína)	Actividad GST (nmol/mg de proteína*min)	Concentración GSH (µg de GSH/mg de proteína)
Sanas	113 ± 4 ^a	216 ± 8 ^a	21 ± 0.2 ^a
Obesas	103 ± 5 ^a	161 ± 3 ^b	13 ± 2 ^c
Té verde	112 ± 7 ^a	142 ± 18 ^b	19 ± 1 ^a
Manzanilla	114 ± 5 ^a	145 ± 14 ^b	12 ± 3 ^c
Hierbabuena	123 ± 4 ^a	162 ± 3 ^b	19 ± 1 ^{ab}
Alcachofa	125 ± 8 ^a	134 ± 2 ^b	15 ± 1 ^{bc}
Toronja	103 ± 5 ^a	148 ± 2 ^b	12 ± 2 ^c

Los valores representan la media ± E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

El mecanismo bajo el cual estas infusiones pueden estar generando un aumento en la actividad antioxidante sugiere la activación de elementos de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) por los polifenoles encontrados en ésta tal como se demuestra para el té verde por Chen y col. (2000).

Para el caso de la alcachofa, a pesar de que no presentó protección antioxidante *in vitro*, ésto no representa su poca actividad *in vivo* ya que no siempre existe una relación directa entre estudios. De igual forma se podría explicar este resultado bajo la hipótesis de que el mecanismo de acción antioxidante no es el de arresto de radicales, siendo entonces el aumento de enzimas antioxidantes al incrementar catalasa y no generar una protección efectiva contra la formación del radical ABTS por ejemplo.

Así mismo, la actividad antioxidante de las infusiones de este estudio podría atribuirse a sus componentes fenólicos a pesar de la baja concentración encontrada, ya que estudios realizados por Vamanu y col. (2011) muestran que

no existe una relación directa entre el contenido de fenoles y su actividad antioxidante para *Cynara scolymus*, reportando como a mayores concentraciones de fenoles y flavonoides de un extracto liofilizado de ésta, menor era su capacidad antioxidante para el ensayo DPPH lo que muestra como a menores concentraciones es más efectivo y a pesar que en nuestro caso no se presentó el mismo efecto de protección a bajas concentraciones para el ensayo similar de ABTS, sí nos sugiere que bajas concentraciones son suficientes para generar un efecto debido a lo encontrado en el sistema antioxidante en riñón.

De igual forma al analizar los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) en tejido renal, en la figura 6 se observa la misma tendencia encontrada en el análisis del sistema antioxidante, ya que tanto el té verde como las infusiones de alcachofa y hierbabuena son las que presentan los mejores resultados al generar niveles estadísticamente más bajos que el obeso, generando una disminución en los niveles de TBARS a pesar que el estado de obesidad no genero niveles altos de oxidación, reflejados en la diferencia no significativa entre los controles sano y obeso. Los animales tratados con la infusión de toronja mostraron valores ligeramente altos respecto al obeso sugiriendo nuevamente que esta infusión presenta una baja capacidad antioxidante.

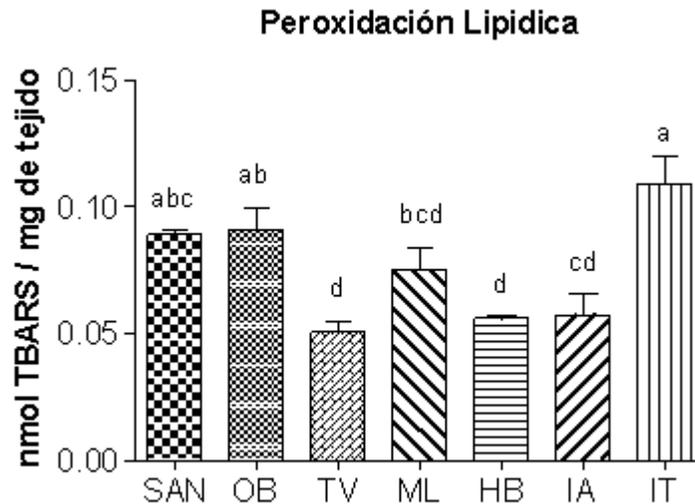


Figura 6. Capacidad antioxidante *in vivo* de las infusiones estudiadas evaluada en riñón de ratas Sprague-Dawley obesas reportado en niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los valores representan la media \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

VIII.6. Efecto del consumo de las infusiones sobre la protección renal en un modelo de obesidad inducida.

La prevalencia de obesidad y su impacto en enfermedades metabólicas y cardiovasculares ha sido ya bien documentado; sin embargo, existen otras afecciones generadas por ésta a las cuales no se les ha dado la misma relevancia como lo es el impacto de la obesidad sobre el riñón (De Jong y col., 2002).

Para poder determinar el efecto protector sobre las alteraciones renales, no sólo se evaluó el sistema antioxidante, también se analizó la función renal. El grupo que recibió la infusión de alcachofa presentó niveles similares al grupo obeso en depuración de creatinina y urea en orina; sin embargo, los niveles de urea en suero fueron incluso más bajos que el control sano. Por el contrario para el grupo correspondiente a la infusión de hierbabuena (que a pesar de presentar niveles altos de fenoles y flavonoides sugiriendo que estos tienen influencia en

el sistema enzimático, tal como en la catalasa y concentracione de GSH), no se observó una mejoría en la depuración y los niveles de urea tanto en suero como en orina encontrando así una depuración de creatinina de 2.65 ± 0.27 mL/min (Cuadro 5) lo que indica una tasa de filtración glomerular alta, lo cual explica los altos niveles de urea y proteína en orina indicando que los riñones no son capaces de filtrar de manera adecuada estas moléculas indicando un daño.

Cuadro 5. Efecto del consumo de infusiones al 1% sobre parámetros de funcionamiento renal de ratas Sprague-Dawley bajo un modelo de obesidad inducida.

Tratamiento	Depuración creatinina (mL/min)	Urea en suero (mg/dL)	Urea en orina (mg/dL)
Sanas	1.59 ± 0.02^b	44.32 ± 2.84^{bc}	78.80 ± 2.91^{bc}
Obesas	0.32 ± 0.05^c	48.18 ± 2.16^{ab}	66.06 ± 2.18^c
Té verde	0.77 ± 0.15^c	56.97 ± 0.21^a	65.68 ± 16.02^c
Manzanilla	0.10 ± 0.20^d	55.76 ± 1.13^{ab}	114.04 ± 3.49^b
Hierbabuena	2.65 ± 0.27^a	46.97 ± 3.33^{abc}	162.65 ± 5.70^a
Alcachofa	0.54 ± 0.05^c	35.76 ± 4.43^c	70.09 ± 7.37^c
Toronja	0.90 ± 0.12^{bc}	43.86 ± 2.47^{bc}	92.21 ± 7.40^{bc}

Los valores representan la media \pm E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

De igual forma, los niveles de proteína fueron elevados para el grupo tratado con la infusión de hierbabuena respecto al control obeso (Cuadro 6). Estudios realizados por Akdogan y col. (2003) con dos especies de hierbabuena (*M. piperita* y *M. spicata*) muestran el efecto tóxico renal de la infusión de la especie *M. spicata*, ya que elevó los valores de urea y creatinina en suero y disminuyó las enzimas antioxidantes en riñón; sin embargo, no encontraron el mismo efecto para *M. piperita* ya que no reportan cambio en sus valores.

Para observar si existe una explicación que relacionara los niveles altos de proteína en orina se realizaron otros estudios en los cuales se cuantificaron los

niveles de proteína en músculo (Cuadro 6); sin embargo, no existió cambio significativo entre los valores.

Cuadro 6.- Efecto de las infusiones sobre la concentración proteica en orina y músculo de ratas Sprague-Dawley obesas.

Tratamiento	Proteína en orina (mg/mL)	Proteína en músculo (mg/mL)
Sanas	2.90 ± 0.74 ^b	1.27 ± 0.02 ^a
Obesas	5.73 ± 0.23 ^a	1.58 ± 0.04 ^a
Té verde	1.22 ± 0.58 ^b	1.30 ± 0.05 ^a
Manzanilla	1.41 ± 0.19 ^b	1.25 ± 0.13 ^a
Hierbabuena	7.02 ± 0.54 ^a	1.42 ± 0.02 ^a
Alcachofa	1.11 ± 0.27 ^b	1.46 ± 0.12 ^a
Toronja	0.96 ± 0.19 ^b	1.35 ± 0.05 ^a

Los valores representan la media ± E.E. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos ($p < 0.05$), evaluado por la prueba de Tukey.

Analizando la información reportada por Akdogan y col. (2003) resulta contradictoria con lo obtenido en este experimento en el cual utilizamos de igual forma *M. piperita*. Sin embargo, cabe mencionar que la infusión de hierbabuena que se administró en nuestro caso es comercial y éste es un factor determinante, ya que el proceso que recibe puede mejorar o disminuir sus propiedades y el efecto benéfico que esperaríamos de nuestra infusión, como es nuestro caso. Esto sugiere que la infusión comercial de hierbabuena utilizada, a pesar de incrementar el estado antioxidante del riñón, no mejora el funcionamiento renal.

IX.-CONCLUSIONES

Los resultados mostrados con anterioridad nos permiten inferir acerca de las diferentes infusiones utilizadas en el estudio y resaltar inicialmente que los compuestos fenólicos en las infusiones de alcachofa y toronja fueron menores respecto a los encontrados en las demás infusiones.

Esta concentración se atribuye al procesamiento que recibió la muestra así como al ensayo para la determinación de fenoles, flavonoides y taninos. De igual forma se atribuye que la capacidad antioxidante *in vitro* presentada por estas infusiones podría estar relacionada con su baja concentración de fenoles totales y taninos.

De igual se forma se concluye, de acuerdo a las diferencias no significativas entre los grupos sano y obeso en parámetros de obesidad, que el modelo de inducción de obesidad funcionó para obtener una diferencia de peso entre ambos controles sin embargo no generó las alteraciones propias de la obesidad.

Dentro de los parámetros de obesidad resultaron ser eficaces la mayoría exceptuando a la infusión de manzanilla. Éstos resultados sugieren que el efecto generado por las infusiones de alcachofa y toronja esta dado por el contenido de ciertos fenoles aunque estén en bajas concentraciones (alcachofa mostrando en nuestro estudio que, los resultados *in vitro* no siempre se reproducen *in vivo* y que cantidades bajas de fenoles presentes en estas infusiones es suficiente para generar un efecto.

Respecto a la protección antioxidante y el funcionamiento renal nuevamente las infusiones de alcachofa, toronja y té verde presentaron mayor actividad enzimática y niveles sin alteración de TBARS urea y depuración de creatinina. Esto coloca a las infusiones de alcachofa y toronja en conjunto con el té verde

como una mejor alternativa para prevenir alteraciones generadas durante la obesidad respecto a las demás infusiones.

A pesar de la infusión de hierbabuena mostró algunos resultados favorables, la variabilidad en los resultados de la protección renal sugieren que algunos tipos de infusiones pueden generar efectos benéficos en solo ciertos parámetros dentro de un modelo de estudio y a la vez afecciones paralelas que se pueden presentar por tratarse de infusiones comerciales procesadas bajo parámetros y estándares particulares que no se pueden controlar dentro del estudio y pueden estar generando éstos resultados contradictorios.

X. BIBLIOGRAFÍA

Akdogan, M., Kiliñç, I., Oncu, M., Karaoz, E. y Delibas, N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. Hum Exp Toxicol [serie en internet] **2003** [consultado 2012 junio 1]; 22: 213-219. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755472>.

Azzini, E., Bugianesi, R., Romano, F., Di Venere, D., Miccadei, S., Durazzo, A., et. al. Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L (cultivar Violetto di Provenza) in human subjects: a pilot study. Br J Nutr [serie en internet] **2007** [consultado 2012 Abril 8]; 97:963-969. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408528>.

Balistreri, C., Caruso, C. y Candore, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. Mediators Inflamm [serie en internet] **2010** [consultado 2012 Abril 8]; 2010: 1-19. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20671929>.

Barbalho, S., Machado, A., Prado, E., Paiva-Filho, M., Aparecida, K., Coelho, N., et. al. *Mentha piperita* effects on wistar rats plasma lipids. Braz Arch Biol Technol [serie en internet] **2009** [consultado 2012 Abril 12]; 52: 1137-1143. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000500011>.

Bing-Hui, L., Xiao-Feng, M., Yan, W. y Wei-X, T. Structure–activity relationship of polyphenols that Inhibit fatty acid synthase. J Biochem [serie en internet] **2005** [consultado 2012 junio 2]; 138: 679–685. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16428296>.

Bundy, R., Walker, A., Middleton, R., Wallis, C. y Simpson, H. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy

hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 Abril 14]; 15: 668-75. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424099>.

Chacko, SM., Thambi, PT., Kuttan, R. y Nishigaki, I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine* [serie en internet] **2010** [consultado 2012 Abril 10]; 5: 13. Disponible en <http://www.cmjournal.org/content/5/1/13/>.

Chen, C., Yu, R, Owuor, ED. y Kong, AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* [serie en internet] **2000** [consultado 2012 junio 1]; 23:605-12. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156183>.

Dallas, C., Gerbi, A., Tenca, G., Juchaux, F., Bernard, FX., Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 julio 5]; 15:783-792. Disponible en [http://www.phytomedicinejournal.com/article/S0944-7113\(08\)00104-9/](http://www.phytomedicinejournal.com/article/S0944-7113(08)00104-9/)

De Jong, PE., Verhave, JC., Pinto-Sietsma, SJ. y Hillege, HL. Obesity and target organ damage: the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* [serie en internet] **2002** [consultado 2012 junio 1]; 26:21-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12457295>.

Do Carmo, JM., Tallam, LS., Roberts, JV., Brandon, EL., Biglane, J., Da Silva, AA., et. al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [serie en internet] **2009** [consultado 2012 Abril 9]; 297: 803-812. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19605765>.

Fernández-Sánchez, A., Madrigal, E., Bautista, M., Esquivel, J., Morales, A., Esquivel, C., et. al. Inflammation, oxidative stress and obesity. *Int J Mol Sci* [serie en internet] **2011** [consultado 2012 junio 2]; 12: 3117-3132. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3116179/>.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. y Rahmat A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* [serie en internet] **2010** [consultado 2012 junio 2]; 15: 4324-4333. Disponible en <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/6/4324>.

Gebhardt, R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* [serie en internet] **1997** [consultado 2012 Abril 14]; 144: 279-286. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194411>.

Gião, MS., González-Sanjosé, ML., Rivero-Pérez, MD., Pereira, C., Pintado, M.E. y Malcata J. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *J Sci Food Agric* [serie en internet] **2007** [consultado 2012 junio 3]; 87:2638-47. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com>.

Goldwasser, J., Cohen, P., Yang, E., Balaguer, P., Yarmush, ML. y Nahmias, Y. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: Role of PPAR α , PPAR γ and LXR α . *J plosone* [serie en internet] **2010** [consultado 2012 junio 3]; 5: e12399. Disponible en <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0012399>.

Gomikawa, S. e Ishikawa, U. Effects of catechins and ground green tea drinking on the susceptibility of plasma and LDL to the oxidation in vitro and in vivo. *J Clin Biochem Nutr* [serie en internet] **2002** [consultado 2012 junio 3]; 32: 55-68. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772610>.

Gosmanova, EO. y Le, NA. Cardiovascular Complications in CKD Patients: Role of Oxidative Stress. *Cardiol Res Pract* [serie en internet] **2011** [consultado 2012 Abril 8]; 2011: 156326. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022166/?tool=pubmed>.

Higdon, JV., Frei, B. Tea Catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* [serie en internet] **2003** [consultado 2012 junio 3]; 43: 89-143. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12587987>.

Ka, MH., Choi, EH., Chun, HS. y Lee, KG. Antioxidative activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissima* roots, peppermint leaves, pine needles and sweet flag leaves. *J Agric Food Chem* [serie en internet] **2005** [consultado 2012 Abril 12]; 53: 4124-4129. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884849>.

Karakaya, S. y Nehir El, S. Total phenols and antioxidant activities of some herbal teas and *in vitro* bioavailability of black tea polyphenols. *GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* [serie en internet] **2006** [consultado 2012 junio 3]; 23: 1-8. Disponible en <http://www.biriz.biz/cay/saglik/biyoyararlilik.pdf>.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. y Jukic, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* [serie en internet] **2006** [consultado 2012 junio 1]; 94: 550-554. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605000105>.

Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A. y Nash, R. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *J Agric Food Chem* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 Abril 12]; 56: 8206–8211. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18681440>.

Koo S. y **Noh S.** Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potencial mechanism for its lipid-lowering effect. *J Nutr Biochem* [serie en internet] **2007** [consultado 2012 junio 1]; 18: 179-183. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296491>.

Lira-García, C., Souto-Gallardo, M., Bacardí-Gascón, M. y Jiménez-Cruz, A. A systematic review of the effectiveness of alternative weight-loss products' ingredients. *Rev de Salud Pública* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 junio 2]; 10: [aprox. pp]. Disponible en <http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S012400642008000500014&script=sciarttext>.

Moraes de Souza, RA., Oldoni, TL., Regitano d'Arce, MA, Alencar, SM. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in brazil. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 junio 2]; 6: 41-47. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/724/72460106.pdf>.

Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P. y Giaccherini, C. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *J Pharm Biomed Anal* [serie en internet] **2004** [consultado 2012 junio 2]; 34: 349-357. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013149>.

Murase, T., Misawa, K., Haramizu, S., Minegishi, Y. y Hase, T. Nootkatone, a characteristic constituent of grapefruit, stimulates energy metabolism and prevents diet-induced obesity by activating AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [serie en internet] **2010** [consultado 2012 Abril 12]; 299: 266-75. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501876>.

Noeman, SA., Hamooda, HE. y Baalash, A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in

rats. Diabetol Metab Syndr [serie en internet] **2011** [consultado 2012 junio 3]; 3: 17. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812977>.

Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. 2008.

Okawa, H., Ohmishi, N. y Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem [serie en internet] **1979** [consultado 2012 junio 3]; 95: 351-358. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383>.

Ozgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Yildirim, A., Coskun, M. y Houghton, P.J. Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (Labiatae) species. Pharm. Biol. [serie en internet] **2006** [consultado 2012 junio 3]; 44: 107-112. Disponible en <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13880200600592061>.

Pi-Sunyer, FX. The medical risks of obesity. Postgrad Med [serie en internet] **2009** [consultado 2012 Abril 9]; 121:21-33. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940414>.

Pizarro, F., Olivares, M., Hertrampf, E. y Walter, T. Factors which modify the nutritional state of iron: tannin content of herbal teas. Arch Latinoam Nutr. [serie en internet] **1994** [consultado 2012 junio 4]; 44:277-80. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8984970>.

Qatanani, M. y Lazar, MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. Genes and Dev [serie en internet] **2007** [consultado 2012 Abril 8]; 21:1443-1455. Disponible en <http://genesdev.cshlp.org/content/21/12/1443.abstract>.

Rastmanesh, R. High polyphenol, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. Chem Biol Interact [serie en internet] **2011**

[consultado 2012 julio 5]; 189:1-15. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955691>.

Rivera, JA. y Muñoz-Hernández, O. Beverage consumption for a healthy life: recommendations for the Mexican population. *Salud pública Méx* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 Abril 10]; 50:173-195. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372998>.

Rodríguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchiel, S., Herrera-Ruiz, D., y Torres, E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in México. *Toxicol Appl Pharmacol* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 Abril 12]; 227:125-135. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2322858/>.

Rusaczonek, A., Żebrowska, M., Waszkiewicz-Robak, B. y Ślusarczyk, E. Evaluation of phenolic compounds content and antioxidant capacity of herbs. *Pol J Food Nutr Sci* [serie en internet] **2007** [consultado 2012 junio 4]; 57: 483-488. Disponible en www.pan.olsztyn.pl/journal/.

Sachse, A. y Wolf, G. Angiotensin II–induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol* [serie en internet] **2007** [consultado 2012 Abril 9]; 18: 2439-2446. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17687073>.

Samarth, RM., Panwar, M., Kumar, M. y Kumar, A. Radioprotective influence of *Mentha piperita* (Linn) against gamma irradiation in mice: Antioxidant and radical scavenging activity. *Int J of Radit Biol* [serie en internet] **2006** [consultado 2012 Abril 12]; 82: 331-7. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782650>.

Schenk, S., Saberi, M. y Olefsky, JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* [serie en internet] **2008** [consultado 2012 Abril 9]; 118: 2992–3002. Disponible en <http://www.jci.org/articles/view/34260>.

Serra, A. y Romero R. La obesidad como causa de enfermedad renal, revisión. Revista española de obesidad [serie en internet] **2009** [consultado 2012 junio 4]; 7: 128-135. Disponible en <http://www.seedo.es/portals/seedo/RevistaObesidad/2009-n4-Revision-La-obesidad-como-causa-de-enfermedad-renal.pdf>

Srivastava, JK., Shankar, E. y Gupta, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. Mol Med Report [serie en internet] **2010** [consultado 2012 junio 4]; 3: 895-901. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995283/>.

Sowers, JR. Metabolic risk factors and renal disease Commentary. Kidney international [serie en internet] **2007** [consultado 2012 Abril 10]; 71: 719-720. Disponible en <http://www.nature.com/ki/journal/v71/n8/full/5002006a.html>.

Tang, J., Yan, H. y Zhuang, S. Inflammation and oxidative stress in obesity-related glomerulopathy. International Journal of Nephrology [serie en internet] **2012** [consultado 2012 Abril 10]; 2012:11. Disponible en <http://www.hindawi.com/journals/ijn/2012/608397/>.

Tappy, L. y Lê, K. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. Physiol Rev [serie en internet] **2009** [consultado 2012 junio 1]; 40: 23-46. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086073>.

Vamanu, E., Vamanu, A., Niță, S. y Colceriu, S. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of *Cynara scolymus* (*Cynarae folium*, *Asteraceae* Family). Trop J Pharm Res [serie en internet] **2011**[consultado 2012 junio 2]; 10: 777-783. Disponible en <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/viewFile/72883/61790>.

Wang, M., Simon, JE., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q. y Tadmor, Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). J

Agric Food Chem [serie en internet] **2003** [consultado 2012 junio 1]; 51: 601-608. Disponible en <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020792b>.

Wider, B., Pittler, MH., Thompson-Coon, J. y Ernst, E. Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolemia. Cochrane Database Syst Rev [serie en internet] **2009** [consultado 2012 Abril 14]; 2002: CD003335. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12137691>.

Wilcox, L., Borradaile, N., De Dreu, L. y Huff M. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. J Lipid Res [serie en internet] **2001** [consultado 2012 junio 1]; 42: 725-734. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352979>.

Yamanaka, N., Oda, O., and Nagao, S. Green tea catechins such as (-)epicatechin and (-)epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density-lipoprotein oxidation in propagation phase. FEBS Lett [serie en internet] **1997** [consultado 2012 junio 2]; 401: 230-234. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013893>.

Yang Chung, S., Lambert, JD. y Sang, S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. Arch Toxicol [serie en internet] **2009** [consultado 2012 Abril 10]; 83: 11-19. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002670>.