



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIAS  
DE INFUSIONES DE LA MEDICINA TRADICIONAL  
MEXICANA COMO ALTERNATIVA EN LA PREVENCIÓN DE  
ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**DIEGO HERNÁNDEZ SAAVEDRA**

DIRIGIDA POR

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO 2011



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIAS DE  
INFUSIONES DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA COMO  
ALTERNATIVA EN LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES  
CRÓNICO-DEGENERATIVAS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**DIEGO HERNANDEZ SAAVEDRA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO**

**SINODALES**

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO**

**DIRECTOR**

**Dr. LUIS MIGUEL SALGADO RODRÍGUEZ**

**SINODAL**

**Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ**

**SINODAL**

**Dra. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ**

**SINODAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	Vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ANEXOS	88
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Obesidad	4
II.2 Índice de masa corporal	4
II.3 Obesidad y homeostasis energética	5
II.3.1. Tejido adiposo	5
II.4 Estrés oxidativo	6
II.5 Proceso inflamatorio	7
II.6 Infusiones	9
II.7 Infusiones y medicina tradicional mexicana	11
II.7.1 Caléndula	11
II.7.2 Pericón	13
II.7.3 Salvia	14
II.8 Capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las infusiones de la medicina tradicional mexicana	15
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	20
V.1 Materiales	20
V.1.1 Reactivos	20
V.1.2 Material vegetal de prueba	20

V.1.3 Material biológico	20
V.2 Métodos	21
V.2.1 Determinación de color y capacidad antioxidante de infusiones de la medicina tradicional mexicana	21
V.2.1.1 Medición de parámetros de color de infusiones de medicina tradicional	21
V.2.1.2 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> con el reactivo 2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH) de infusiones de medicina tradicional	22
V.2.1.3. Deteminación de LDL oxidada	22
V.2.1.4. Cuantificación de flavonoides	23
V.2.1.5. Cuantificación de fenoles totales	23
V.2.2 Determinación del efecto de infusiones sobre el desarrollo de obesidad	24
V.2.2.1 Medición de peso corporal	25
V.2.3 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia de tejido adiposo	25
V.2.3.1 Preparación de adipocitos	25
V.2.3.2 Tinción de hematoxilina & eosina	25
V.2.3.3 Cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo	26
V.2.4 Evaluación del daño a tejido hepático	26
V.2.4.1 Evaluación del contenido lipídico en hígado	26
V.2.4.2 Determinación de proteínas oxidadas en hígado	27
V.2.5 Presencia de enfermedades crónico- degenerativas relacionadas con obesidad	27

V.2.5.1 Diagnóstico de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina	27
V.2.5.2 Evaluación del riesgo a enfermedades cardiovasculares	28
V.2.5.3 Evaluación del daño renal	28
V.2.5.3.1 Cuantificación de proteína en orina	28
V.2.5.3.2 Determinación de proteínas oxidadas en riñón	29
V.2.5.3.3 Peroxidación lipídica en fracción post-mitocondrial (PMS) en tejido renal	29
V.2.6 Evaluación de inflamación	30
V.3 Análisis estadístico	30
VI. RESULTADOS	31
VI.1 Determinación de color y capacidad antioxidante de infusiones de la medicina tradicional mexicana	31
VI.1.1 Medición de parámetros de color de infusiones de medicina tradicional	31
VI.1.2 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides	32
VI.1.3 Evaluación de la capacidad antioxidante in vitro	33
VI.1.3.1 Reducción del radical libre estable difenilpicrilhidrazil (DPPH).	33
VI.1.3.2 Inhibición de oxidación de LDL	35
VI.2 Determinación del efecto de infusiones sobre el desarrollo de obesidad	37
VI.2.1 Peso corporal y consumo de alimento	37
VI.3 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia	38

de tejido adiposo	
VI.3.1 Evaluación del contenido lipídico en tejido adiposo	39
VI.4 Evaluación del daño a tejido hepático	40
VI.4.1 Evaluación del contenido lipídico en hígado	40
VI.4.2 Determinación de proteínas oxidadas en hígado	41
VI.5 Presencia de enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con obesidad	42
VI.5.1 Diagnóstico de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina	42
VI.5.2 Evaluación del riesgo a enfermedades cardiovasculares	45
VI.5.3 Evaluación del daño renal	47
VI.5.3.1 Cuantificación de proteína en orina	47
VI.5.3.2 Determinación de proteínas oxidadas en riñón	48
VI.5.3.3 Peroxidación lipídica en fracción post-mitocondrial (PMS) en tejido renal	48
VI.6 Evaluación de marcadores de inflamación	49
VII. DISCUSIÓN	53
VII.1 Determinación de color y capacidad antioxidante de infusiones de la medicina tradicional mexicana	53
VII.1.1 Medición de parámetros de color de infusiones de medicina tradicional	53
VII.1.2 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides	54

VII.1.3 Evaluación de la capacidad antioxidante in vitro	55
VII.1.3.1 Reducción del radical libre estable difenilpicrilhidrazil (DPPH).	55
VII.1.3.2 Inhibición de oxidación de LDL	56
VII.2 Determinación del efecto de infusiones sobre el desarrollo de obesidad	57
VII.2.1 Peso corporal y consumo de alimento	57
VII.3 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia de tejido adiposo	58
VII.3.1 Evaluación del contenido lipídico en tejido adiposo	59
VII.4 Evaluación del daño a tejido hepático	62
VII.4.1 Evaluación del contenido lipídico en hígado	62
VII.4.2 Determinación de proteínas oxidadas en hígado	63
VII.5 Marcadores de riesgo a enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con obesidad	64
VII.5.1 Diagnóstico de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina	64
VII.5.2 Evaluación del riesgo a enfermedades cardiovasculares	66
VII.5.3 Evaluación del daño renal	69
VII.5.3.1 Cuantificación de proteína en orina	69
VII.5.3.2 Determinación de proteínas oxidadas en riñón	70
VII.5.3.3 Peroxidación lipídica en fracción post-mitocondrial (PMS) en tejido renal	70

VII.6 Evaluación de marcadores de inflamación	72
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. BIBLIOGRAFÍA	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividad antioxidante y quelante de las infusiones tradicionales.	15
2	Compuestos fenólicos, flavonoides totales e inhibición de COX-2.	16
3	Grupos experimentales	24
4	Parámetros de color de infusiones herbales	31
5	Evaluación microscópica del tamaño de adipocitos	38
6	Resultados de glucosa, insulina sérica y cálculo de Homeostasis Model Assessment (HOMA) de animales tratados con infusiones herbales	44
7	Evaluación del perfil lipídico	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de obesidad y sobrepeso en México	4
2	Origen celular de las especies reactivas de oxígeno, sus dianas, y sistemas antioxidantes	7
3	Proceso Inflamatorio en tejido adiposo	8
4	<i>Calendula officinalis</i> Linn. (Caléndula)	12
5	<i>Hypericum perforatum</i> (Pericón)	13
6	<i>Salvia officinalis</i> (Salvia real)	14
7	Contenido de compuestos fenólicos de las infusiones herbales	32
8	Contenido de flavonoides totales de las infusiones herbales	33
9	Porcentaje de reducción de radical DPPH a diferentes concentraciones de las infusiones herbales	34
10	Concentración inhibitoria media con el método DPPH	34
11	Porcentaje de inhibición de la oxidación de LDL	35
12	Concentración inhibitoria media con el método de inhibición de oxidación de LDL	36
13	Consumo de alimento (a) y registro de peso corporal (b) de los animales tratados con infusiones herbales	37
14	Cuantificación de triglicéridos de tejido adiposo visceral	39
15	Concentración de triglicéridos séricos en animales tratados con infusiones herbales	40
16	Concentración de triglicéridos en tejido hepático de animales tratados con infusiones herbales	41
17	Concentración de residuos carbonilo en tejido hepático de animales tratados con infusiones herbales	42
18	Curva de tolerancia a la glucosa de los animales tratados con infusiones herbales	43
19	Índice aterogénico (c-LDL/c-HDL) de los animales tratados con infusiones herbales	46



20	Concentración de proteína en la orina de animales tratados con infusiones herbales	47
21	Cuantificación de residuos carbonilo en tejido renal	48
22	Evaluación de la peroxidación lipídica en la fracción postmitocondrial de tejido renal	49
23	Cuantificación de los niveles del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ sérica	50
24	Cuantificación de los niveles de proteína C-reactiva sérica	50
25	Cuantificación de los niveles de leptina sérica	51
26	Cuantificación de los niveles de adiponectina sérica	52

## RESUMEN

La obesidad es una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado, causada por el incremento de masa de tejido adiposo. Alternativas preventivas de esta enfermedad pueden ser plantas usadas en medicina tradicional para procesos inflamatorios agudos, tales como: *Calendula officinalis* Linn., *Salvia officinalis* e *Hypericum perforatum*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de infusiones de plantas medicinales mexicanas para prevención de enfermedades crónico degenerativas relacionadas con obesidad. Se midió la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de cada una de las infusiones en estudio, siendo pericón y caléndula las que mostraron los mejores resultados. Ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa, aunado al consumo de infusiones al 1% durante 12 semanas; al término de este período se llevaron a cabo las diferentes evaluaciones. Se realizó la medición del peso corporal y tamaño de adipocitos, donde se observaron disminuciones para los tres tratamientos. Para evaluar las enfermedades relacionadas a la obesidad se determinaron los niveles de glucosa basal e insulina, donde pericón y caléndula presentaron disminución. Estas mismas infusiones mostraron mejores resultados para la prevención de enfermedades cardiovasculares con disminución de proteína C reactiva e índice aterogénico. Sólo pericón y salvia otorgaron protección renal. Las mejores propiedades antiinflamatorias se obtuvieron para pericón, disminuyendo niveles de TNF- $\alpha$  y leptina, y aumentando adiponectina en suero. En base a estos resultados se concluye que las infusiones evaluadas mostraron beneficios a la salud, siendo el pericón, la que presento la mayor actividad biológica.

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han presentado cambios importantes en el estilo de vida de la población mundial, incrementándose el consumo de alimentos procesados y omitiendo una rutina de actividad física. Aunado a esto, se tiene la predisposición genética lo cual en conjunto conlleva al desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, así como a la obesidad, cuya prevalencia ha aumentado año con año, siendo México el segundo lugar a nivel mundial.

La obesidad es una enfermedad multifactorial y es considerada un factor de riesgo de una serie de padecimientos, como lo son diabetes mellitus, síndrome metabólico, hipertensión arterial, dislipidemias y algunos tipos de cáncer; dichas enfermedades se generan por el alto consumo de grasa, azúcar y comida rápida, que en conjunto con la falta de actividad física, contribuyen al rápido deterioro de la salud de la población mexicana.

En la obesidad se presenta un incremento del estrés oxidativo, lo que conduce a un estado inflamatorio de bajo grado que es determinante en el desarrollo de las enfermedades como diabetes, enfermedades cardiovasculares y renales.

Existen varias recomendaciones para la prevención de enfermedades asociadas a la obesidad, tales recomendaciones comienzan con la implementación de una dieta saludable, que incluyen bebidas con bajo contenido calórico, como las infusiones naturales, las cuales ofrecen al consumidor compuestos con beneficios a la salud, además de que algunas preparaciones presentan sabores muy agradables. Plantas utilizadas por la población mexicana como infusiones herbales se consumen ampliamente.

La medicina tradicional mexicana constituye una vasta colección de plantas que pueden tener características ideales para la preparación de dichas bebidas

nutracéuticas; sin embargo, estas han sido poco o nulamente estudiadas, ignorando su potencial terapéutico. En base a todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de algunas infusiones tradicionales sobre el control de la obesidad y sus complicaciones renales, cardiovasculares y endócrinas.

México es un país que ha tenido una fuerte transición epidemiológica, incrementando la prevalencia de enfermedades crónico degenerativas. Estas patologías han crecido de manera alarmante en las últimas dos décadas, principalmente la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Esto se debe a los cambios alimenticios y de estilo de vida, donde el fácil acceso a comida rápida, con precios bajos pero altos en contenido energético, se ha incrementado notablemente, generando una alteración en el metabolismo y desarrollando mayor prediponibilidad a dichas enfermedades.

La justificada preocupación por el aumento de la obesidad en México ha identificado como una de las prioridades para la población la disminución de la ingesta de energía y la adopción de patrones saludables de consumo de alimentos y bebidas para los mexicanos. Durante el periodo de 1999 a 2006 se duplicó el consumo de energía a partir de bebidas en todos los grupos de edad; siendo éste un incremento sin precedentes en el ámbito internacional. Las infusiones naturales ofrecen al consumidor una base de composición con grandes beneficios, además de que algunas de estas preparaciones presentan sabores muy agradables. Plantas utilizadas por la población mexicana como infusiones herbales se consumen ampliamente.

Por siglos, las hierbas se han usado como alimentos o para propósitos medicinales, sin embargo, la medicina tradicional ha incrementado su popularidad en los últimos años, convirtiéndose en uno de los mercados de mayor ganancias económicas. Se ha reportado que varias hierbas tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes y

estas son usadas para tratar desórdenes inflamatorios como aquellos causados por especies reactivas del oxígeno. Con respecto al té verde, existen varios estudios epidemiológicos que han demostrado que el consumo de tres tazas grandes de té verde (720 mL) al día se relaciona con 11% de disminución del riesgo de sufrir infarto del miocardio. En base a lo anterior, en este estudio se planteó evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio de las infusiones medicinales utilizadas por la población mexicana en padecimientos como obesidad y sus enfermedades derivadas.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Obesidad

La obesidad, como enfermedad crónico-degenerativa y multifactorial se entiende como el resultado de un consumo excesivo de calorías más allá de las necesidades energéticas (Morton y col., 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la prevalencia de obesidad en México es del 20-30% según un censo realizado en la población adulta en 2006, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2006 (Barquera y col., 2009)(Figura 1).

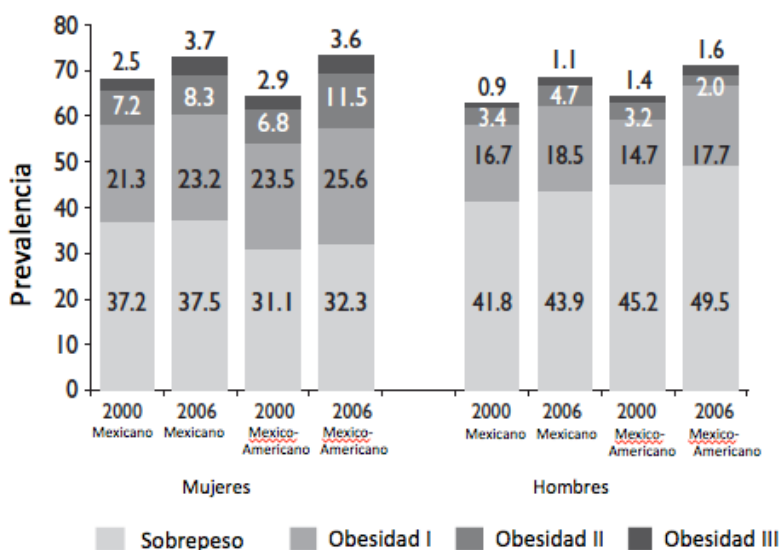


Figura 1. Prevalencia de obesidad y sobrepeso en México (ENSANUT 2006). IMC,  $\text{kg}/\text{m}^2$ , rango: sobrepeso 25.0-29.9; obesidad tipo I 30.0-34.9; obesidad tipo II 35.0-39.9; obesidad tipo III  $\geq 40.0$ .

### II.2 Índice de masa corporal

El Índice de masa corporal (IMC) ó índice de Quetelet proporciona información acerca de el contenido de grasa corporal. Éste parámetro proviene de una simple relación del peso corporal en kilogramos y la raíz cuadrado de su talla en metros, puede utilizarse como un indicador de corpulencia para la clasificación de

diferentes grados de adiposidad, como una definición de malnutrición por exceso o defecto, y como indicador de morbilidad y mortalidad ( $IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$ ) por su capacidad de detección de estados de malnutrición (Rodríguez-Martínez y col., 2010).

### II.3 Obesidad y homeostasis energética

En 1984, Faust y colaboradores sugirieron que en el adipocito, cuando alcanza un tamaño crítico, se desencadenan eventos sucesivos que llevan al aumento del número de células adiposas. El aumento en el tamaño celular ocurre antes de aumentar la celularidad, esto de una manera dependiente al almacén de grasa, tanto en obesidad por factores genéticos como en aquella inducida por la dieta (Marques y col., 1998).

Diferencias regionales en la hipertrofia e hiperplasia de tejido adiposo sugieren que los factores de crecimiento producidos localmente pueden estar involucrados en la regulación de la adipogénesis (Hausman y col., 1993).

#### II.3.1. Tejido adiposo

El tejido adiposo ayuda en la regulación de la energía; el tejido adiposo blanco almacena energía en forma de triglicéridos como respuesta al consumo calórico excesivo por encima del gasto energético, mientras que el tejido adiposo café, mediante la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP1) tiene la capacidad de disipar energía a través de termogénesis adaptativa. Sin embargo, el tejido adiposo blanco tiene un papel regulador importante más allá de la homeostasis energética (Allende-Vigo y col., 2010).

La regulación del peso corporal es controlada por varios mecanismos entre los que se incluyen hormonas y neurotransmisores, así como, actividad física y factores ambientales y genéticos. El apetito y el consumo de alimento son controlados por circuitos neuroendócrinos que regulan a su vez el metabolismo de los adipocitos. El centro de apetito hipotalámico es regulado por varios factores como insulina, leptina, grelina, péptido similar al glucagon-1 y pro-opiomelanocortina, como también un estímulo adrenérgico (Morton y col., 2006).

#### II.4 Estrés oxidativo

Las células en situaciones normales tienen reacciones de oxido-reducción como resultado de los procesos naturales del metabolismo en los que se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) que funcionan como mensajeros y es mantenida en concentraciones normales por sistemas antioxidantes naturales. Sin embargo, al haber una alteración en la homeostasis energética de la célula se comienzan a generar procesos que deterioran el funcionamiento metabólico y celular que incrementan la producción de ERO (Figura 2). El estrés oxidativo se define como una condición en la que la homeostasis del estado redox se ve comprometida, esto es, que la célula pierde la capacidad de contrarrestar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), y con esto provocar un ambiente tóxico con peróxidos y radicales libres con la capacidad de dañar componentes celulares como lípidos, proteínas e incluso DNA.

Estudios realizados en animales y humanos sugieren que el estrés oxidativo está involucrado en respuesta a una alimentación desbalanceada. En modelos animales de enfermedades metabólicas como obesidad y diabetes, ratones ob/ob, db/db, AY y ratones tratados con estreptozotocina, se encuentran patrones similares de marcadores de estrés oxidativo los cuales se incrementan de manera proporcional a la acumulación de grasa y diabetes (Brookheart y col., 2009).



## II.5 Proceso inflamatorio

El estado redox es vital para un buen funcionamiento celular, es por esto que la misma producción de radicales libres, ERO y ERN, generados en la obesidad debido a una acumulación lipídica en los adipocitos, activa diversas vías de señalización intracelular como la del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que propicia la expresión de moléculas que son mediadoras de la respuesta inmune. Ésta respuesta inadecuada del cuerpo termina por promover daños a órganos completos. Algunas de estas respuestas incluyen un aumento en la presión sanguínea, un estado proinflamatorio de bajo grado y un estado protrombótico que se generan por diversos factores humorales secretados por diversos órganos discapacitados (Ribeiro y col., 2009).

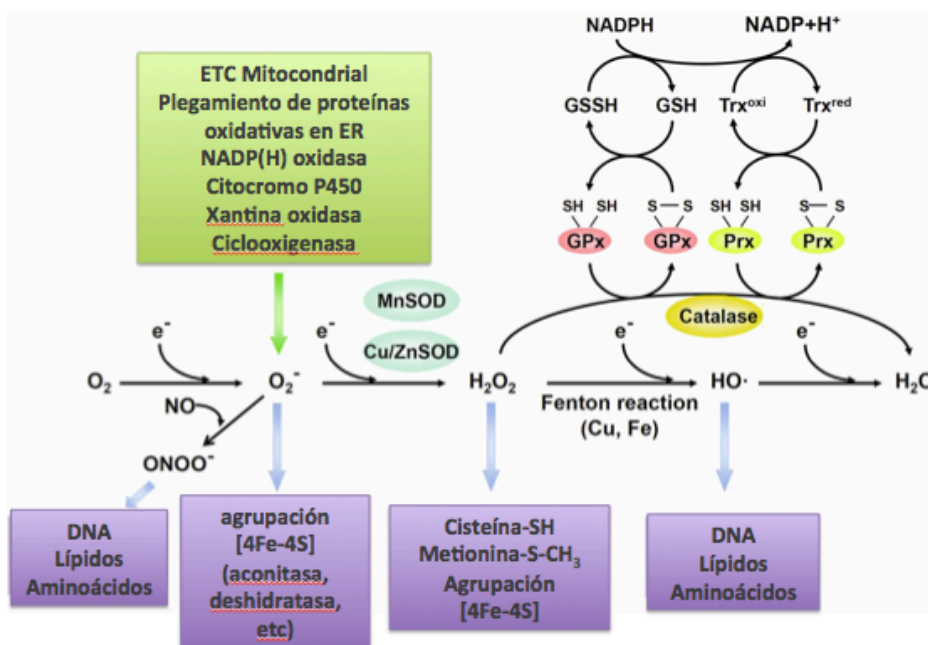


Figura 2. Origen celular de las especies reactivas de oxígeno, sus blancos y sistemas antioxidantes. ETC, cadena de transporte de electrones; ER, retículo endoplásmico; NADP(H), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; MnSOD, superóxido dismutasa de manganeso; Cu/ZnSOD, superóxido dismutasa de cobre/zinc; GPx, glutatión peroxidasa; Prx, peroxirredoxina; Trx, tiorredoxina.

El proceso inflamatorio (Figura 3) se ve mediado por citocinas que son secretadas por las células dañadas y funcionan como señalizadores de inflamación; poseen la capacidad de reclutar células como los monocitos y macrófagos que responden ante la inflamación, activa a su vez procesos en cadena en diversos órganos como el hígado, riñones y tejido adiposo en donde se forma una red de comunicación humoral generando no sólo daños aislados de órganos, como el hígado, sino produciendo un deterioro generalizado.

Dentro de las proteínas activadas por NF- $\kappa$ B se encuentran el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), leptina, resistina, Inhibidor de activador de Plasminógeno (PAI-1), Proteína C reactiva (PCR), P-selectina, Molécula de adhesión al endotelio vascular (VCAM-1) y la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Cachofeiro, 2006)

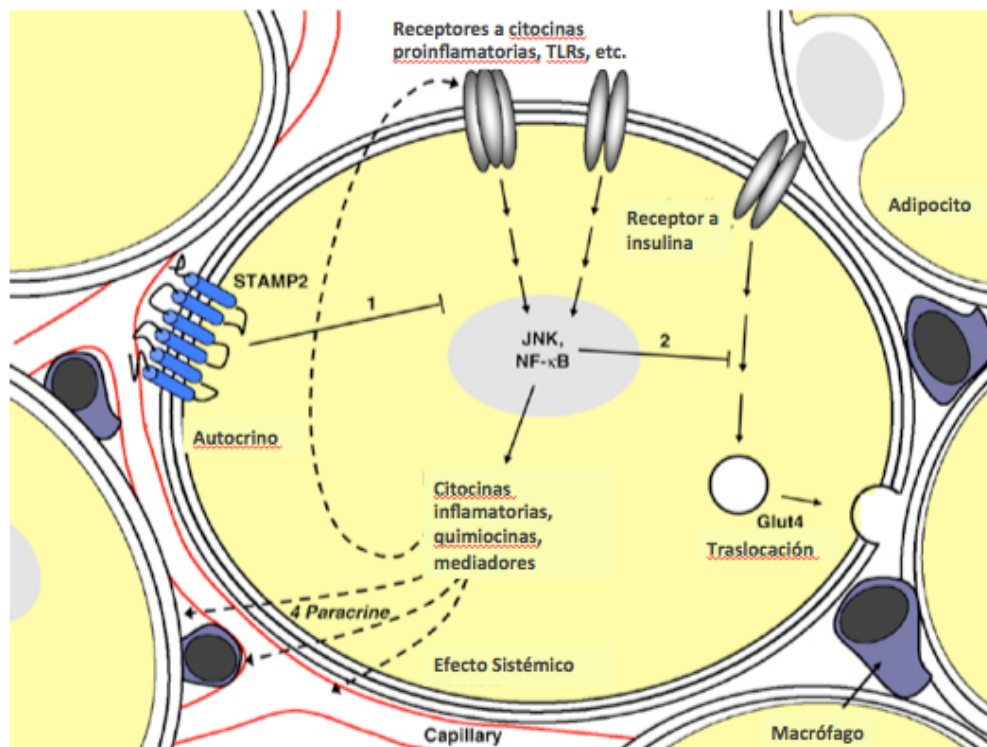


Figura 3. Proceso Inflamatorio en tejido adiposo.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que en la obesidad se presenta un

proceso inflamatorio crónico de bajo nivel, ya que existe un aumento de los niveles circulantes no sólo de citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), sino también de proteínas de la fase aguda como la proteína C reactiva, P-selectina, VCAM-1 y la haptoglobina en sujetos obesos (Mendell y col., 1996; Pi-Sunyer, 2002).

En pacientes con obesidad y diabetes tipo2 (DT2), la activación de citocinas proinflamatorias correlaciona estrechamente con el NF- $\kappa$ B. No obstante, los adipocitos secretan adiponectina, cuyas propiedades antiinflamatorias son ejecutadas a través de su acción inhibitoria sobre el NF- $\kappa$ B y, además, los niveles de adiponectina correlacionan de manera inversa en pacientes con obesidad y DT2 (Blancas-Flores y col., 2010).

## II.6 Infusiones

Una de las estrategias que se tienen para disminuir la obesidad es mediante la implementación de una alimentación completa y balanceada, esto es disminuir el consumo de azúcares y otros edulcorantes calóricos añadidos en los alimentos (O'Connor y col., 2006), además aumentar la disponibilidad y accesibilidad de alimentos reducidos o sin edulcorantes calóricos añadidos.

En los últimos años se han buscado alternativas para reducir el riesgo a presentar enfermedades metabólicas, entre dichas alternativas se han propuesto diversos medicamentos que reducen de manera considerable la masa corporal, como es el caso de Sibutramina, la cual actúa inhibiendo la recaptación de serotonina, dopamina y norepinefrina a través de sus dos metabolitos activos, provocando de esta manera un estímulo prolongado sobre el centro de saciedad, disminuyendo el apetito, y generando en forma paralela- un aumento en el gasto de energía. Sin embargo el uso indiscriminado de medicamentos trae consigo efectos adversos que

nos llevan a la búsqueda de sustancias naturales que tengan mínimo efectos secundarios y posean máximos beneficios.

Alternativas naturales se han enfocado en ciertas infusiones con características promisorias como el té verde que ha resultado ser un gran complemento para la reducción del riesgo de enfermedades. En estudios poblacionales, el consumo de té verde, se ha asociado con un gran número de beneficios a la salud que incluyen desde la disminución en el riesgo de enfermedades cardiovasculares hasta cáncer (Stanhope y col., 2009).

El té verde también se ha relacionado con la capacidad de disminuir el peso corporal. Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* de té verde han demostrado que catequinas provenientes del té verde y la epigallocatequina galato (EGCG), pueden disminuir la diferenciación y proliferación en adipocitos, lipogénesis, absorción de lípidos, triglicéridos en plasma, ácidos grasos libres, colesterol, glucosa, insulina y leptina, aumentan la beta-oxidación y la termogénesis. Los sitios blancos principales para el té verde son tejido adiposo, hígado, intestino y músculo esquelético (Wolfram y col., 2005).

Adicional a los beneficios antes mencionados, el té verde es considerado como una fuente dietaria de antioxidantes; es rico en polifenoles (catequinas y ácido gálico), pero también contienen carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico (vitamina C), minerales como Cr, Mn, Se, o Zn y varios compuestos fitoquímicos. Estos compuestos pueden incrementar el potencial antioxidante de los polifenoles del té verde.

El mecanismo de acción de los polifenoles del té verde se atribuye a su capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y su actividad para quelar iones como hierro, previendo su participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (estrés oxidativo). Pueden funcionar también indirectamente como

antioxidantes a través de: la inhibición de factores de transcripción sensibles al estado redox; inhibición de enzimas pro-oxidantes como la sintasa inducible de óxido nítrico, lipooxigenasas, ciclooxigenasas y xantinoxidasas; inducción de enzimas antioxidantes como la glutatión-S-transferasa y la superóxido dismutasa (Cabrera y col., 2006).

## II.7 Infusiones y medicina tradicional mexicana

En México el uso de plantas para el tratamiento de diversos padecimientos es amplio, normalmente paciente que son diagnosticados en algún centro médico primario se les prescribe el medicamento adecuado, sin embargo, un alto porcentaje de la población recurre al uso de las plantas como terapia alternativa (Andrade-Cetto y col., 2005).

En los últimos años las plantas utilizadas en medicina tradicional mexicana han sido objeto de varios estudios fitoquímicos, bioquímicos y biológicos. Dentro de los materiales más utilizados para procesos inflamatorios agudos, como los golpes o alteraciones gastrointestinales se encuentran la caléndula (*Calendula officinalis* Linn.), pericón o yiauhtli (*Hypericum perforatum*) y salvia real (*Salvia officinalis*). Si bien todos los estudios relacionados con éstas planta medicinales son enfocados a la obtención de efectos localizados, no hay referencias de estudios en los que se busque el efecto sistémico de su administración a sistemas biológicos.

### II.7.1 Caléndula (*Calendula officinalis* Linn.)

Caléndula es una planta herbácea, aromática, glandular, de anual a perenne, leñosa únicamente en la base (Figura 4). El tallo es de 20 a 55 cm de altura, es erecto, ramificado y generalmente con hojas casi hasta el extremo superior. Las hojas son de 7-14 x 1-4 cm, son alternas, simples, oblongas-lanceolada. Las flores son liguladas y amarillas, con una floración que dura prácticamente todo el año. Las

inflorescencias se presentan en capítulos de 3-5 cm de ancho, de un color amarillo anaranjado (Figura 6). El olor que desprenden las flores es desagradable y su sabor es amargo.



Figura 4. *Calendula officinalis* Linn (caléndula).

Se usa como planta ornamental y desde hace siglos se utiliza como planta medicinal para diferentes enfermedades relacionadas con la piel y comúnmente como cicatrizantes para disminuir inflamación. Se ha usado para el tratamiento de enfermedades dermatológicas, dolor en general, como fuerte bactericida, antiséptico y antiinflamatorio. Algunas casas comerciales de productos homeopáticos utilizan la caléndula contra las laceraciones y grietas de manos y pies.

Se ha reportado que un extracto de caléndula disminuye la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y CRP en ratones BALB/C albinos (Preethi y col., 2008). El compuesto químico identificado y relacionado con los beneficios de *Calendula officinalis* L. es la calendulina. Algunos otros compuestos identificados en los pétalos son triterpenoides esterificados, carotenoides, flavoxantinas, auroxantinas, quinonas y cumarinas (Konark Group Ltd., 2011). Caléndula ha probado ser efectiva para protección hepática y renal contra el estrés oxidativo, además de estimular la expresión de sistemas antioxidantes (Preethi, 2009), y es capaz de

disminuir parámetros inflamatorios de manera dosis dependiente, y disminuir la expresión de enzimas que favorecen inflamación como COX-2 (Preethi, 2008).

### II.7.2 Pericón (*Hypericum perforatum*)

El pericón es también conocido como Hierba de San Juan. Planta variable, erecta, con tallos lampiños, ramificados y cilíndricos (Figura 5). Las hojas son triangulares, opuestas, con bordes redondeados y poseen innumerables glándulas aceitosas, lo que hace que parezcan perforadas. Lo más característico es la flor, amarilla, de cinco pétalos y sépalos más pequeños, cubiertos de rayas y glándulas negras.

Entre los compuestos principales identificados en el pericón se encuentran aceites esenciales, polifenoles (ácido caféico y clorogénico), flavonoides (hiperósido), taninos y pigmentos. Tiene propiedades antiespasmódicas, sedantes y antidepresivas. Es un buen astringente y antihemorrágico. En uso externo, es antiséptico, cicatrizante y astringente. El aceite de hipérico se emplea para tratar la gastritis (Murcia y col., 2008).



Figura 5. *Hypericum perforatum* (pericón).

En un estudio realizado por Zheleva-Dimitrova y colaboradores (2010) se analizaron trece especies de *Hypericum* y analizaron su actividad atrapadora de radicales libres, actividad antioxidante, taninos y flavonoides totales, obteniendo el mayor contenido de taninos y flavonoides totales para la especie *Hypericum perforatum*, además valores elevados de capacidad atrapadora de radicales evaluada por tres diferentes técnicas (FRAP, ABTS y DPPH), además Orčić y colaboradores (2011) confirman la actividad antioxidante de pericón por DPPH atrapamiento de NO, atrapamiento de superóxidos, peroxidación lipídica y FRAP.

### II.7.3. Salvia (*Salvia officinalis*)



Figura 6. *Salvia officinalis* (Salvia real).

Es una planta aromática de la familia *Lamiaceae*; si bien su apariencia varía de herbáceo a arbustivo, la presencia del labelo superior de la flor bilabiada muy conspicuo y curvado hacia abajo permite su identificación (Figura 6). La salvia tiene usos ornamentales, medicinales y gastronómicos, empleándose como condimento. También es habitual en España tomarla como infusión. *Salvia officinalis* es una planta con propiedades antidiabéticas, adicionalmente se demostró que induce la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa o la superóxido dismutasa, así mismo, incrementa significativamente la expresión de las proteínas de choque



térmico (Hsp 70) en lisados de linfocitos humanos a las dos semanas de tratamiento, las cuales poseen un efecto antiinflamatorio (Sá y col., 2009).

Algunos compuestos identificados en salvia son los flavonoides, taninos, estrógenos, principios amargos (sesquiterpeno lactonas, monoterpeno iridoides, secoiridoides). Estudios de salvia indican que posee propiedades antihiperlipidémicas como la inhibición de absorción intestinal de grasas, estimulación de la oxidación de grasas (Kianbakht, 2011) y además disminuye la presencia de ERO y los daños causados por éstas (Oboh, 2009); finalmente estudios realizados en pericón apuntan a un efecto antiobesigénico para la disminución de la acumulación de grasa en tejido adiposo (Amini, 2009).

#### II.8. Capacidad antioxidante y antiinflamatoria de infusiones de medicina tradicional.

Cuadro 1. Actividad antioxidante y quelante de las infusiones tradicionales.

	$\mu\text{mol eq. TROLOX/ mL}$	$\mu\text{g eq FeSO}_4/\text{mL}$	$\text{mg EDTA/mL}$
Caléndula	$0.68 \pm 0.01^d$	$461.2 \pm 3.8^d$	$10.01 \pm 0.05^a$
Pericón	$4.22 \pm 0.03^a$	$3217.1 \pm 76.2^a$	$1.19 \pm 0.09^f$
Salvia	$2.10 \pm 0.006^b$	$1492.6 \pm 18.3^b$	$2.56 \pm 0.06^e$
Té			
verde(Lagg's)	$4.89 \pm 0.18^a$	$4031.9 \pm 17.5^a$	$4.58 \pm 0.16^a$

Letras diferentes entre columna indican diferencia estadística significativa entre las diferentes plantas ( $P \leq 0.05$ ).

Los antioxidantes naturales presentes en las infusiones de la medicina tradicional mexicana son una alternativa para los sistemas antioxidantes biológicos. En un estudio previo realizado por Rivas y colaboradores (2010), se determinó la capacidad antioxidante y quelante de infusiones no comerciales de caléndula,

pericón y salvia. Los resultados obtenidos demuestran que la capacidad para atrapar radicales libres de pericón es similar al té verde, al igual que para la capacidad de donar electrones. En cuanto a la capacidad quelante caléndula presenta propiedades superiores al té verde (Cuadro 1) (Rivas, 2010).

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles, en especial el grupo carbonilo, de ser atacados por los radicales libres. Dentro de los aminoácidos, la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína son los que presentan mayor predisposición a ser oxidados (Davies y col., 1987). Dicha oxidación puede dar lugar a una alteración estructural o conformacional de la proteína y con ello modificar o perder su función.

Cuadro 2. Compuestos fenólicos, flavonoides totales e inhibición de COX-2.

Muestra	Fenoles totales µg eq ac. gálico/mL	Flavonoides totales µg eq (+) catequina/mL	Inhibición COX-2 (%)
Pericón	410.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	337.8 ± 4.0 <sup>a</sup>	50.7 ± 8.9 <sup>a</sup>
Salvia	221.2 ± 2.2 <sup>b</sup>	259.6 ± 3.9 <sup>b</sup>	60.5 ± 10.0 <sup>a</sup>
Caléndula	85.5 ± 1.2 <sup>e</sup>	66.9 ± 1.2 <sup>e</sup>	67.7 ± 4.1 <sup>a</sup>

Los datos son la media de dos experimentos independientes ± la desviación estándar.<sup>a</sup> Valores con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (Tukey  $\alpha < 0.05$ ).

En los procesos de daño oxidativo a proteínas algunos aminoácidos se oxidan dando grupos carbonilos, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como indicador de daño oxidativo de las mismas (Stadtman, 1992); para valorar el daño oxidativo a las proteínas y de las membranas, se utiliza la determinación de los restos carbonilo de las proteínas (Davies y col., 1987) la aparición de restos de grupo carbonilo puede ser usado como indicador bioquímico

de oxidación de proteínas. El grado de cambio de color es correlacionado con la concentración de antioxidante en la muestra.

En otro estudio se cuantificaron los compuestos fenólicos presentes en infusiones de pericón, caléndula y salvia donde se relaciona la cantidad de estos compuestos con el efecto de inhibición de COX-2, siendo salvia la que presenta mayor potencial inhibitorio (Cuadro 2) (Mendoza-Díaz y col., 2010).

### **III. HIPÓTESIS**

Las infusiones de *Salvia officinalis* (salvia real), *Hypericum perforatum* (pericón) y *Calendula officinalis* Linn (caléndula) disminuyen el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como obesidad y las derivadas de ésta como diabetes, daño renal, hepático y enfermedades cardiovasculares en un modelo de obesidad inducido por dieta, debido a que presentan actividad antioxidante y/o antiinflamatoria.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Evaluar las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de infusiones de *Salvia officinalis* (Salvia real), *Hypericum perforatum* (pericón), *Calendula officinalis* Linn. (caléndula) y determinar su capacidad disminuir el riesgo enfermedades crónico degenerativas relacionadas con obesidad.

### IV.2 Específicos

- Evaluar las propiedades antioxidantes *in vitro* de las infusiones en estudio.
- Determinar el efecto de las infusiones sobre la disminución de peso corporal y el aumento de adiposidad.
- Medir la capacidad de las infusiones para disminuir la resistencia a la insulina, alteraciones renales y cardiovasculares.
- Valorar las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de las infusiones en estudio.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Reactivos

Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ), fosfato monobásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato dibásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ácido tricloroacético (TCA), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), butanol, sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), ácido tiobarbitúrico (TBA) de J. T. Baker, Nueva Jersey, USA. albúmina bovina sérica (BSA) de Roche, Germany. peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 2,4 dinitro fenil hidracina (DNPH), guanidina, ácido ascórbico de Sigma Aldrich, St. Louis, USA. Reactivo precipitante de LDL de Linconl Lab. Texas, USA, Azul de Coomasie de BIO-RAD, Filadefia, USA.

#### V.1.2 Material vegetal de prueba

El material vegetal del estudio fue *Salvia officinalis* (Salvia real), *Hypericum perforatum* (Pericón), *Calendula officinalis* Linn. (Caléndula), las cuales se obtuvieron de mercados locales y se identificaron por la especialista en botánica M. en C. Valentina Serrano. El material se secó en un horno de convección a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  por 1 día y posteriormente se molió para su análisis.

#### V.1.3 Material biológico

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso corporal entre 220-250 g, las cuales se adquirieron en el bioterio Rismart, S.A. de C.V, Distrito Federal, México. Se aclimataron una semana con alimento base (NIH-4, Rismart), posteriormente se realizó la clasificación de los grupos de forma homogénea.

## V.2 Métodos

### V.2.1 Determinación de color y cuantificación de las propiedades antioxidantes de las infusiones de medicina tradicional mexicana

Se pesaron 2 g de material seco y molido se mezclaron con 200 mL (1%) de agua hirviendo y se dejaron en agitación por 10 minutos cubiertos con un papel aluminio. Posteriormente se filtraron las infusiones, y se dejaron enfriar antes de administrar tratamiento a los animales; todas las determinaciones se realizaron de infusiones frescas.

#### V.2.1.1. Medición de parámetros de color de las infusiones tradicionales

Las mediciones se realizaron en un colorímetro Minolta, Cr-300, Japón. Para las mediciones se utilizó un tubo al cual se le adicionaron 7 mL de infusión herbal, ésta se cubrió en la parte superior y se introdujo en el equipo. Los valores de color se reportaron como L,  $a^*$  y  $b^*$ . L mide el grado de luminosidad, desde cero para negro hasta cien para blanco. Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  son indicativos de la cromaticidad. Los valores positivos de  $a^*$ , están relacionados con el color rojo, y los valores positivos de  $b^*$  están relacionados con el color amarillo. Con los valores de  $a^*$  y  $b^*$  se calcularon los valores de cromaticidad es decir, el grado de diferencia existente entre un color y un gris de su misma luminosidad y claridad, que corresponde con la saturación del color percibido, también llamado croma. El matiz es como se percibe el color de un objeto: rojo, anaranjado, verde, azul, etc. Los valores del ángulo matiz para las infusiones y tés nos indican que se encuentran dentro del cuadrante que va del amarillo al rojo.

### V.2.1.2 Evaluación de la capacidad antioxidante con el reactivo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil radical (DPPH).

La inhibición en la producción del radical DPPH o capacidad antioxidante fue evaluada de acuerdo al procedimiento descrito por Calero-Sánchez y colaboradores (2010). Brevemente, se pesaron 1.23 mg del radical estable DPPH y se disolvieron en etanol hasta obtener una solución 100  $\mu\text{M}$  del DPPH. La mezcla de reacción se preparó en una proporción 1:10 (1 volumen de muestra por 10 de la solución etanólica 100  $\mu\text{M}$  de DPPH) con o sin la muestra en un volumen final de 3.0 mL. Las concentraciones 0.6-24.0  $\mu\text{g}$  de peso seco/mL se utilizaron para cada una de las infusiones (*Salvia officinalis* [Salvia real], *Hypericum perforatum* [Pericón], *Calendula officinalis* Linn. [Caléndula]). Después de una incubación a 37 °C por 30 minutos, se midió la absorbancia a 517 nm. La actividad para secuestrar radicales de las infusiones se determinó en base a la disminución de los valores de absorbancia, y posteriormente los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la formación del radical DPPH. Para el cálculo de  $\text{IC}_{50}$  se graficó el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de reducción de la oxidación, y se realizó la comparación con un estándar puro de (+)-catequina.

### V.2.1.3. Capacidad de inhibición de la LDL oxidada

Con la técnica descrita por Chang y colaboradores (2000), se evaluó la capacidad de las infusiones para prevenir la oxidación de la LDL. Se utilizó una muestra de suero humano al que se le adicionó un reactivo precipitante, se centrifugó 4000 rpm por 15 minutos y se desechó el sobrenadante, el precipitado corresponde al LDL con una porción de VLDL. El precipitado se resuspendió en PBS (amortiguador de fosfato salino) y se cuantificó la proteína total de la suspensión por el método convencional de Bradford. Las concentraciones 0.6-24.0  $\mu\text{g}$  de peso seco/mL se utilizaron para cada una de las infusiones (*Salvia officinalis* [Salvia real], *Hypericum perforatum* [Pericón], *Calendula officinalis* Linn. [Caléndula]). Para la medición de



LDLox se realizó una oxidación con ácido tiobarbitúrico y se precipitó con ácido tricloroacético, las infusiones se agregan para prevenir la oxidación de LDL, y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda 532 nm y se calculó el porcentaje de inhibición de la oxidación con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de oxidación} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} * 100$$

El cálculo del IC<sub>50</sub> se realizó de igual manera que para el radical DPPH.

#### V.2.1.2 Cuantificación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides se realizó por la metodología descrita por Martínez y colaboradores (2007). Para llevar a cabo la cuantificación se tomaron 200 µL de la infusión y se adicionaron 720 µL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 80 µL de una solución de 2-aminoetil-difenilborato al 1%, y se procedió a leer la absorbancia a 404 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se interpolan en una curva de rutina, donde los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina / g de peso seco.

#### V.2.1.2 Cuantificación de fenoles totales

Se determinaron por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999), el cual se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) que al reducirse da una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a 760 nm. Para la cuantificación de fenoles totales. se tomó una alícuota de 40 µL de infusión herbal y se llevó a un volumen final de 500 µL, posteriormente se mezcló con 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), después se adicionaron 1250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 %), se dejó reposar

en la oscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. La cuantificación se realizó por interpolación de los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 µg), y se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico / g de peso seco.

### V.2.2 Determinación del efecto de las infusiones sobre el desarrollo de la obesidad

Los animales se clasificaron en cinco grupos, uno de éstos fue el control sano con dieta estándar (proteínas 21.8%, lípidos 12%, carbohidratos 65%) y el resto de los grupos se alimentaron con una dieta alta en grasa y fructosa (HFF, proteínas 18%, lípidos 35%, carbohidratos 46%). Estos últimos grupos se dividieron a su vez en control y tratamientos con infusiones al 1%: caléndula, pericón y salvia (Cuadro 3.). El tratamiento con infusiones se proporcionó al mismo tiempo que la dieta alta en grasa y dicho tratamiento duró tres meses.

Cuadro 3. Grupos experimentales.

Grupo	Dieta	Bebida
Control sano	Dieta estándar <sup>1</sup>	Agua
Control HFF	Dieta alta en grasa y fructosa <sup>2</sup>	Agua
Calendula	Dieta alta en grasa y fructosa <sup>2</sup>	Infusión de caléndula 1%
Pericón	Dieta alta en grasa y fructosa <sup>2</sup>	Infusión de pericón 1%
Salvia	Dieta alta en grasa y fructosa <sup>2</sup>	Infusión de salvia 1%

<sup>1</sup> Dieta estándar ([DE] proteínas 21.8%, lípidos 12%, carbohidratos 65%), <sup>2</sup> dieta alta en grasa y fructosa ([HFF] proteínas 18.36%, lípidos 35.07%, carbohidratos 46.56%).

### V.2.2.1 Medición del peso corporal y consumo de alimento

Se realizó la medición de peso corporal de forma semanal, además de la medición del consumo de alimento diariamente.

### V.2.3 Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos.

#### V.2.3.1. Preparación de adipocitos

Se realizó la extracción de tejido adiposo visceral abdominal de cada uno de los animales se registró el peso total del órgano y se depositaron en una solución de formalina al 4%, después se almacenaron en un lugar seco y fresco en la oscuridad.

#### V.2.3.2. Tinción de hematoxilina y eosina

Los tejidos se lavaron con una solución amortiguadora de formalina al 10% por un día y se procesaron de una manera rutinaria para histología, brevemente, se realizó un procedimiento de deshidratación y rehidratación del tejido variando las proporciones de xileno:etanol absoluto y finalmente con agua, posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes con un grosor de 5  $\mu\text{m}$  por sección con un microtomo, posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el análisis microscópico. Se realizó la medición microscópica del diámetro (expresado en  $\mu\text{m}$ ) y área de adipocitos (expresado en  $\mu\text{m}^2$ ) por campo para determinar el nivel de hipertrofia de tejido adiposo.

### V.2.3.3. Cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo

Para la cuantificación de triglicéridos en tejido adiposo visceral se utilizó el método de Folch y colaboradores (1951). Se realizó una extracción del contenido total de lípidos con una mezcla cloroformo:metanol 2:1 y seguida de una homogenización y una filtración del homogenado. El filtrado, el cual contiene los lípidos de los tejidos acompañado de sustancias no lipídicas, es liberado de éstas por adición de un quinto del volumen del extracto de NaCl 0.02% para obtener un sistema bifásico. La fase superior se desechó, la fase inferior contenía esencialmente el total de lípidos de los tejidos. Con el extracto final se procedió a realizar una cuantificación de triglicéridos por el método enzimático de Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Reino Unido). Los resultados son expresados en mg de triglicéridos / g de tejido.

### V.2.4 Evaluación del daño a tejido hepático.

#### V.2.4.1 Cuantificación del contenido lipídico en hígado

Para la cuantificación de triglicéridos de tejido hepático se utilizó el método descrito por Seo y colaboradores (2010). Brevemente, muestras de tejido hepático se lisaron con hidróxido de potasio etanólico (2 partes de etanol: 1 parte de KOH 30%), y se incubaron durante toda la noche a 55 °C. A los lisados se les adiciona un volumen de una solución de agua:etanol (1:1), y se centrifugaron por 5 minutos a 7,500 rpm. El sobrenadante se mezcló con cloruro de magnesio 1M, posteriormente se incubó en hielo por 10 minutos, y se centrifugó por 5 minutos a 7,500 rpm. El sobrenadante se empleó para las mediciones de triglicéridos con un kit enzimático Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Reino Unido). Los resultados son expresados en mg de triglicéridos / g de tejido.

#### V.2.4.2 Determinación de proteínas oxidadas en tejido hepático

Para la evaluación de daño hepático se realizará la cuantificación de proteínas oxidadas en hígado, en la que se preparó un homogenado de hígado y se realizó la extracción de proteínas totales. Posteriormente, se realizó el procedimiento de cuantificación de restos carbonilos descrito anteriormente por Davies y colaboradores (1987). Brevemente, éste método está basado en la reacción de los restos carbonilo de la proteínas con la DNPH, donde se forma un derivado de color, posteriormente se precipitó utilizando TCA y se cuantificaron los restos carbonilos midiendo su absorbancia a 375 nm. Los resultados se expresaron en nmol de restos carbonilo / mg de proteínas totales.

#### V.2.5. Presencia de enfermedades crónico degenerativas relacionadas con la obesidad

##### V.2.5.1 Diagnóstico de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina

Se obtuvieron muestras de sangre en el momento del sacrificio, del cual se determinó en plasma los niveles de glucosa en ayuno y la curva de tolerancia a la glucosa utilizando un glucómetro Accu-Check® Performa (Roche), para la curva de tolerancia a la glucosa se administró una dosis de glucosa de 4 g/kg de peso del animal y se realizaron mediciones de glucosa a un tiempo cero y cada 30 minutos hasta un tiempo de 120 minutos. De las muestras obtenidas en ayuno se les cuantificaron los niveles de insulina en suero mediante la técnica de ELISA con kits de la marca Invitrogen (Carlsbad, USA), y la medición de los niveles de glucosa por el kit enzimático de Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Reino Unido). Posteriormente se realizó el cálculo de índice HOMA (Homeostasis Model Assesment) para evaluar el nivel de resistencia a la insulina mediante la ecuación:  $HOMA = \text{insulina en ayuno } (\mu\text{U/mL}) \times [\text{glucosa en ayuno (mmol/L)/22.5}]$ . Los

resultados se expresarán en unidades arbitrarias (UA), resultados superiores a 10 UA se considera como mayor resistencia a la insulina.

#### V.2.5.2 Evaluación del desarrollo de enfermedades cardiovasculares

En plasma se determinó el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total, c-HDL) mediante kits enzimáticos de Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Reino Unido), y la determinación de c-LDL se calculó mediante la ecuación de Friedewald y colaboradores (1972):

$$\text{LDL-Colesterol} = \text{Colesterol Total} - \left( \frac{\text{Triglicéridos}}{5} + \text{HDL-Colesterol} \right)$$

Los niveles plasmáticos de la proteína C reactiva se evaluaron mediante la técnica de ELISA con kit de la marca Invitrogen. Posteriormente se realizó la evaluación del índice aterogénico mediante la siguiente fórmula: c-LDL/ c-HDL expresado en unidades arbitrarias, y con ello propensión a presencia de ateromas, donde a valores menores a 3 unidades arbitrarias hay una disminución del riesgo aterogénico, y valores superiores se potencia el riesgo.

#### V.2.5.3 Evaluación de daño renal

##### V.2.5.3.1. Cuantificación de proteína en orina

Se realizó la cuantificación de proteína en orina por el método de Bradford, que se basa en la unión del colorante, Comassie Blue G-250 en su forma aniónica a proteínas, donde se forma un complejo que resulta en un cambio en la coloración de un rojo-café a un color azulado. Esta coloración se mide a la absorbancia de 595 nm. Los resultados se interpolan en una curva de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones, y los resultados se expresan en mg/dL en 24hr.

#### V.2.5.3.2. Determinación de proteínas oxidadas en riñón.

Para la evaluación de daño renal se realizó la cuantificación de proteínas oxidadas en riñón. Se homogenizó el riñón con una baqueta y se realizó la extracción de proteínas totales, posteriormente se realizó el mismo procedimiento de cuantificación de restos carbonilos descrito anteriormente (Davies y col., 1987), omitiendo el paso de oxidación de la proteína. Los resultados se expresan en nmol de restos carbonilo / mg de proteína total.

#### V.2.5.3.3. Peroxidación lipídica de la fracción post-mitocondrial (PMS) de tejido renal

La medición se realizó mediante el método descrito por Kaur y colaboradores (2005), para lo cual se realizó una extracción previa de la fracción mitocondrial del homogenado de tejido de riñón usando solución amortiguadora de fosfatos (0.1M, pH 7.4) el cual contiene KCl (1.17%). Se pesaron 100 mg de tejido y se le adicionó 1200  $\mu$ L de solución amortiguadora, se trituró el tejido y se sometió a centrifugación a 400 rpm por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante, desechando el pellet el cual contiene fracción nuclear. El sobrenadante se centrifugó nuevamente por 5000 rpm por 20 minutos. Se retira el sobrenadante que contiene la fracción post-mitocondrial (PMS) para evaluar los lípidos oxidados de membrana. El volumen final de reacción fue de 1mL, para lo cual se colocaron 850  $\mu$ L de PMS y 150  $\mu$ L de buffer pH 7.4 sin KCl, seguido de 1 mL de ácido tricloacético (10%) y 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Se sometió a incubación ( $\approx$ 100°C) por 20 minutos para formar el complejo MDA-TBA. Se adicionó 2.5 mL de butanol y se leyó a 532 nm. El análisis de resultados se llevo a cabo usando el coeficiente de extinción molar  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### V.2.6. Evaluación de parámetros de inflamación

De muestras de plasma se cuantificó en los animales las concentraciones de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína C-reactiva (CRP), leptina y adiponectina, mediante la técnica de ELISA con kits de la marca Invitrogen.

#### V.3. Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media  $\pm$  error estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Para la comparación de los tratamientos contra un control se empleó el método de Dunnett y la comparación entre todos los tratamientos con la prueba de Tukey. Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 5.0.1.



## VI. RESULTADOS

### VI.1 Determinación de color y cuantificación de las propiedades antioxidantes de las infusiones de medicina tradicional mexicana

#### VI.1.1. Medición de parámetros de color de las infusiones tradicionales

Se realizó la medición de los parámetros de color del sistema CIELab para las infusiones de *Salvia officinalis* (Salvia real), *Hypericum perforatum* (Pericón), *Calendula officinalis* Linn. (Caléndula) preparadas al 1%, los resultados se muestran en el Cuadro 4. El valor de L\* mayor se obtuvo para la infusión de pericón ( $23.02 \pm 0.43$ ), seguido de la infusión de caléndula ( $18.28 \pm 0.08$ ), y finalmente té verde ( $17.97 \pm 3.17$ ) y salvia ( $16.90 \pm 0.75$ ); no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 4. Parámetros de color de infusiones de la medicina tradicional.

	L*	a*	b*	C*	h°
Caléndula	$18.28 \pm 0.08^a$	$5.17 \pm 0.06^{ab}$	$14.83 \pm 0.10^a$	$15.71 \pm 0.12^a$	$70.77 \pm 0.08^{ab}$
Pericón	$23.02 \pm 0.43^a$	$2.27 \pm 0.38^b$	$18.96 \pm 0.30^a$	$19.10 \pm 0.25^a$	$83.16 \pm 1.24^a$
Salvia	$16.90 \pm 0.75^a$	$6.53 \pm 0.64^{ab}$	$14.51 \pm 2.48^a$	$15.96 \pm 1.99^a$	$65.38 \pm 5.81^b$
Té verde	$17.97 \pm 3.17^a$	$9.33 \pm 2.11^a$	$16.35 \pm 1.75^a$	$18.84 \pm 2.57^a$	$60.49 \pm 2.96^b$

Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey.

El valor de a\* mayor se obtuvo para la infusión de té verde ( $9.33 \pm 2.11$ ) significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) a todas las infusiones, seguido de la infusión

de salvia ( $6.53 \pm 0.64$ ) y caléndula ( $5.17 \pm 0.06$ ) significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) a té verde y pericón, y finalmente la infusión de pericón ( $2.27 \pm 0.38$ ). El valor de  $b^*$  mayor se obtuvo para la infusión de pericón ( $18.96 \pm 0.30$ ), seguido de la infusión de té verde ( $16.35 \pm 1.75$ ), consecutivamente se encontraron caléndula ( $14.83 \pm 0.10$ ) y salvia ( $14.51 \pm 2.48$ ); no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre infusiones. El valor de  $C^*$  mayor se obtuvo para la infusión de pericón ( $19.10 \pm 0.25$ ), seguido de la infusión de té verde ( $18.84 \pm 2.57$ ), y por último salvia ( $15.96 \pm 1.99$ ) y caléndula ( $15.71 \pm 0.12$ ); no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas. El valor de  $h^o$  mayor se obtuvo para la infusión de pericón ( $83.16 \pm 1.24$ ) siendo significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) al resto de las infusiones, después se encontró a la infusión de caléndula ( $70.77 \pm 0.08$ ), y por último salvia ( $65.38 \pm 5.81$ ) y té verde ( $60.49 \pm 2.96$ ) significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) a té verde y caléndula.

#### VI.1.2. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

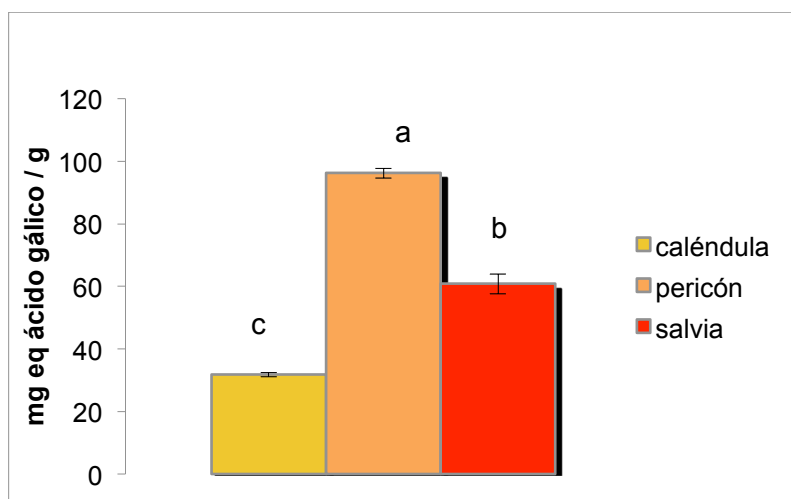


Figura 7. Contenido de compuestos fenólicos de las infusiones herbales. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE ( $n=3$ ). <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) con la prueba de Tukey.

Respecto al contenido de compuestos fenólicos se obtuvieron valores más elevados para la infusión de pericón ( $96.2 \pm 1.6$  mg eq de ácido gálico / g), seguido

de la infusión de salvia ( $60.7 \pm 3.16$  mg eq de ácido gálico / g). Finalmente, la infusión de caléndula presentó el menor contenido de compuestos fenólicos con valores de  $31.8 \pm 0.69$  mg eq de ácido gálico / g ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 7).

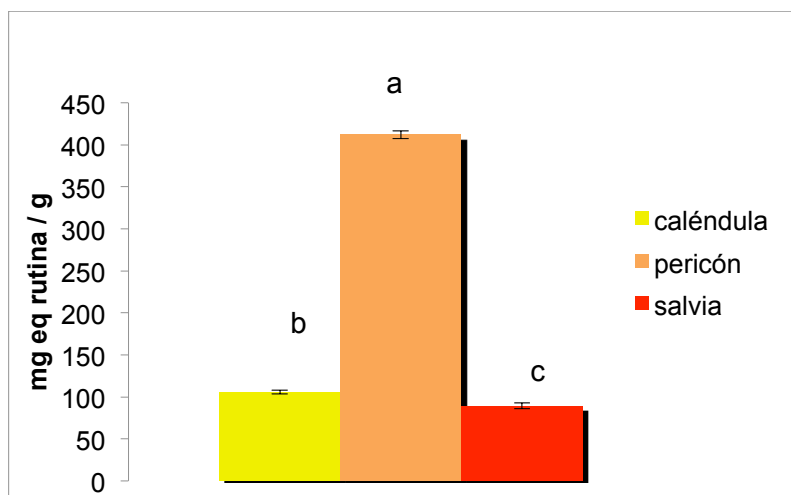


Figura 8. Contenido de flavonoides totales de las infusiones herbales. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE (n=3). Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey.

Se realizó también la cuantificación de flavonoides en las infusiones y el valor más alto fue para la infusión de pericón con  $412.1 \pm 4.7$  mg eq de rutina / g de peso seco, y valores de  $105.6 \pm 2.4$  y  $89.3 \pm 3.6$  mg eq de rutina / g de peso seco para las infusiones de caléndula y salvia respectivamente, mostrando diferencia estadística significativa entre las tres infusiones ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 8).

### VI.1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

#### VI.1.3.1. Reducción del radical libre estable difenil picril hidrazil (DPPH).

Se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante de las infusiones en estudio por el método de DPPH, ésta técnica determina la inhibición de la formación del radical DPPH por las infusiones.

El mayor porcentaje de inhibición de la formación del radical DPPH se registró para la infusión de pericón a la concentración 12.12  $\mu\text{g/mL}$  con un porcentaje de inhibición de 88.96%, y al evaluar las infusiones restantes a ésta concentración máxima de inhibición de la reacción, se obtuvo para la infusión de salvia un 67.31% y para caléndula 47.97% (Figura 9).

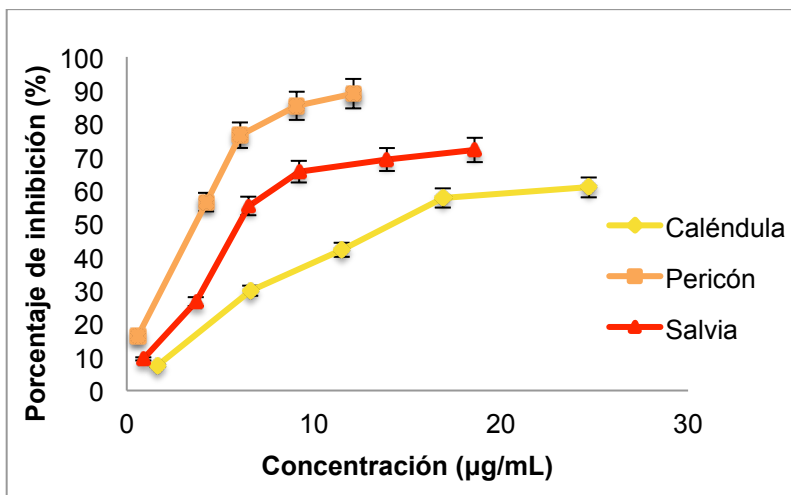


Figura 9. Porcentaje de reducción del radical DPPH a diferentes concentraciones de las infusiones herbales. Los datos se expresan como la media  $\pm$  EE (n=3).

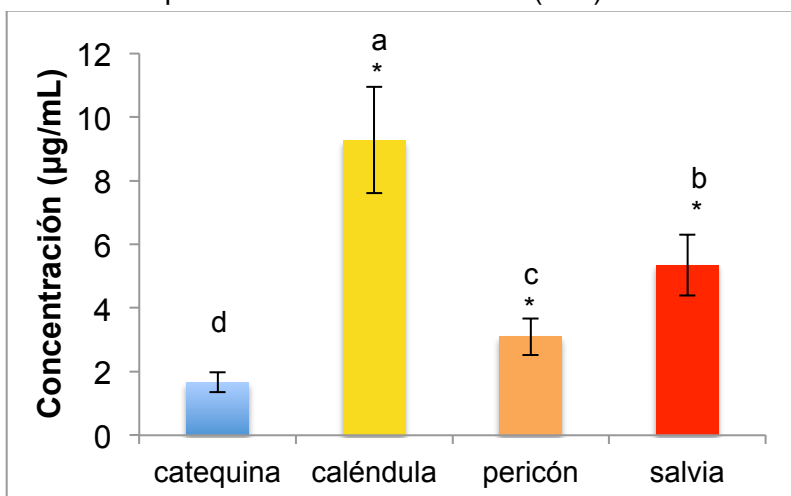


Figura 10. Concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de las infusiones herbales utilizando el método DPPH. Los datos son representados como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes indican diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) con la prueba de Tukey.

Posteriormente en la Figura 10, se muestran los resultados del cálculo de la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) para cada una de las infusiones con el método de DPPH. La  $IC_{50}$  menor registrada corresponde a la infusión de pericón con un valor de  $3.1 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$ , seguido de la infusión de salvia ( $5.35 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ ), y finalmente la infusión de caléndula con la  $IC_{50}$  mayor ( $9.27 \pm 1.67 \mu\text{g/mL}$ ), con diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre infusiones (Figura 10), y diferentes estadísticamente del estándar de catequina.

#### VI.1.3.2. Inhibición de oxidación de LDL

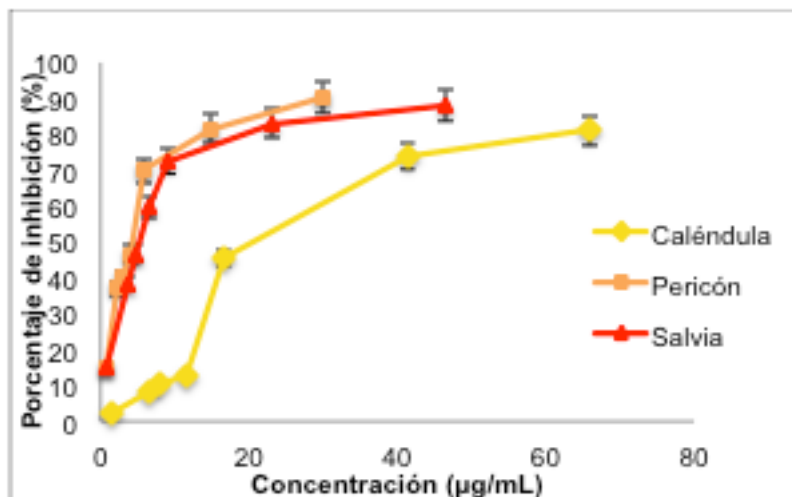


Figura 11. Porcentajes de inhibición de oxidación de LDL por las infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3).

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de las infusiones en estudio mediante la inhibición de la oxidación de LDL, ésta técnica determina la inhibición de la formación subproductos de la oxidación de lípidos (malondialdehído) por parte de las infusiones. El mayor porcentaje de inhibición de oxidación de LDL se registró para la infusión de pericón a la concentración  $30 \mu\text{g/mL}$  con un porcentaje de inhibición de 90.40%, y al evaluar las infusiones restantes a ésta concentración

máxima de inhibición de la reacción, se obtuvo para la infusión de salvia un 86.06% y para caléndula 49.17% (Figura 11).

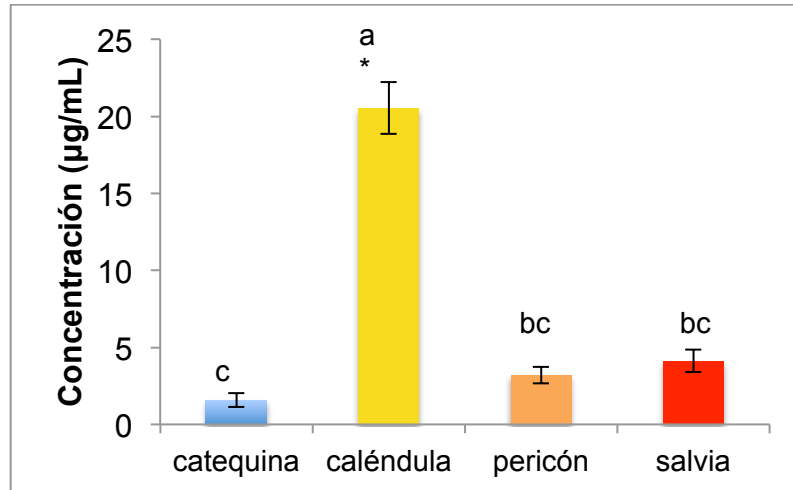
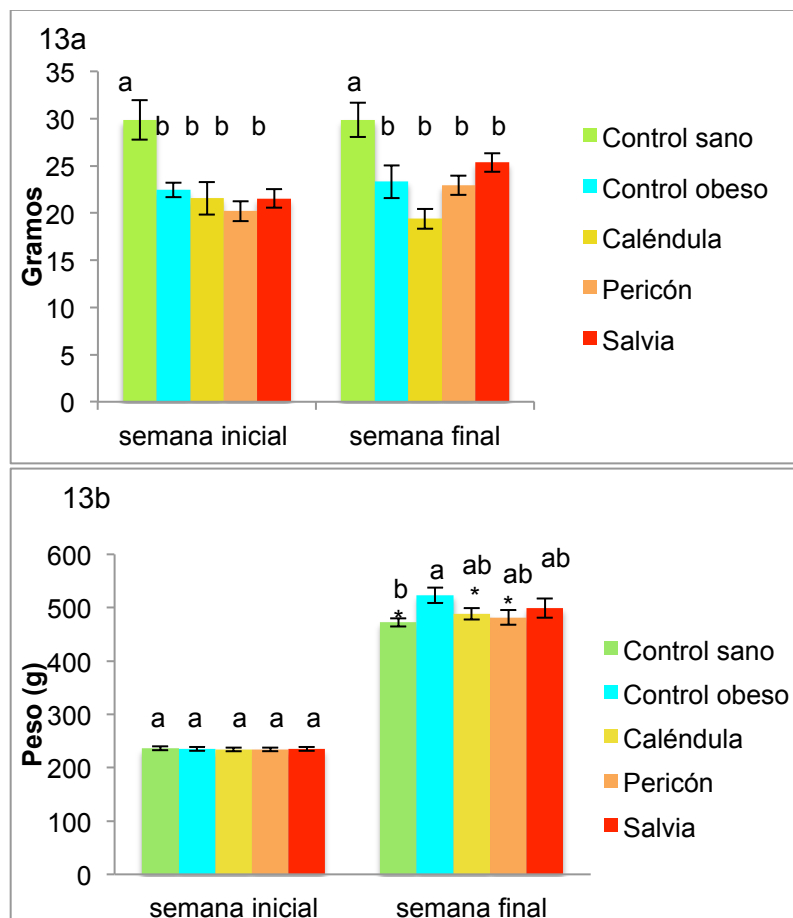


Figura 12. Concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de las infusiones herbales utilizando el método de inhibición de oxidación de LDL. Los datos son representados como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey.

Posteriormente en la Figura 12, se muestran los resultados del cálculo de la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) para cada una de las infusiones mediante la inhibición de la oxidación de LDL. La  $IC_{50}$  menor registrada corresponde a la infusión de pericón con un valor de  $3.2 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$ , seguido de la infusión de salvia ( $4.11 \pm 0.72 \mu\text{g/mL}$ ), sin diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) contra el estándar de catequina, y finalmente la infusión de caléndula con la  $IC_{50}$  mayor ( $20.55 \pm 0.68 \mu\text{g/mL}$ ), con diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a pericón y salvia (Figura 10).

## VI.2. Determinación del efecto de las infusiones sobre el desarrollo de la obesidad

### VI.2.1. Peso corporal y consumo de alimento



Figura

13. Consumo de alimento (a) y registro de peso corporal (b) de los animales tratados con infusiones herbales. Los datos son representados como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b</sup> Letras diferentes indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  contra el control obeso con la prueba de Dunnett.

En la Figura 13a se presentan los resultados de peso corporal al final del periodo (semana 12) de experimentación. Se puede observar que el consumo de alimento para el control sano fue mayor durante todo el experimento comparado con los grupos con dieta HFF (Figura 13a). Los grupos con alimentación HFF no presentan diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre grupos.

En la Figura 13b se puede observar sólo las infusiones de caléndula y pericón logran tener una reducción del peso corporal ( $488.38 \pm 10.49$  y  $481.4 \pm 13.72$ g), comparado contra el control obeso ( $523.41 \pm 14.6$ g). El control sano ( $472.42 \pm 7.6$  g) presenta diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control obeso.

### VI.3. Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos.

Se evaluó en cortes histológicos el tamaño de los adipocitos de tejido adiposo abdominal visceral. En el cuadro 5 se pueden observar los resultados para el diámetro de adipocitos, donde los tratamientos presentan valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores de hipertrofia de adipocitos con valores de  $94.97 \pm 0.88$ ,  $91.88 \pm 0.89$  y  $92.22 \pm 0.99$   $\mu\text{m}$  contra en control obeso que presenta un valor de  $121.6 \pm 1.96$   $\mu\text{m}$ . Similares resultados se reportan para el área promedio de adipocitos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación microscópica del tamaño de adipocitos de animales tratados con infusiones herbales.

	Diámetro <sup>1</sup>	Área <sup>2</sup>
Control sano	$73.22 \pm 1.03$ <sup>d*</sup>	$4345 \pm 120$ <sup>d*</sup>
Control obeso	$121.60 \pm 1.96$ <sup>a</sup>	$11991 \pm 431$ <sup>a</sup>
Caléndula 1%	$94.97 \pm 0.88$ <sup>b*</sup>	$7275 \pm 139$ <sup>b*</sup>
Pericón 1%	$91.88 \pm 0.89$ <sup>c*</sup>	$6881 \pm 134$ <sup>c*</sup>
Salvia 1%	$92.22 \pm 0.99$ <sup>c*</sup>	$6980 \pm 151$ <sup>bc*</sup>

Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3); <sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey, \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  contra el control obeso en cada columna con la prueba de Dunnet. <sup>1</sup> Unidades expresadas en  $\mu\text{m}$ ; <sup>2</sup> Unidades expresadas en  $\mu\text{m}^2$ .



En la Anexo1. se observan microfotografías de cortes histológicos de tejido adiposo visceral de animales control y cada uno de los tratamientos, teñidos con hematoxilina y eosina, observados con un aumento 10X.

### VI.3. 1 Evaluación del contenido lipídico en tejido adiposo

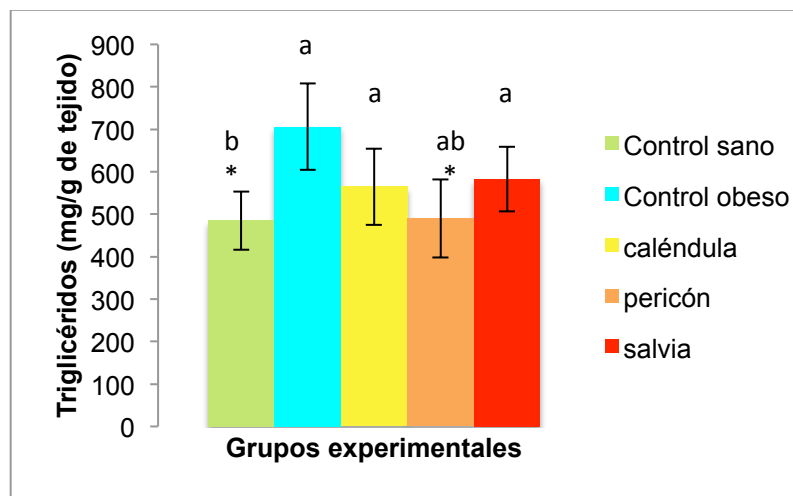


Figura 14. Concentración de triglicéridos en tejido adiposo visceral abdominal de animales tratados con infusiones. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  contra el control obeso con la prueba de Dunnet.

Además de evaluar la acumulación de grasa de manera microscópica con corte histológicos (Anexo1.), se realizó la cuantificación de triglicéridos de tejido adiposo, en el que se extraen los lípidos totales de una cierta cantidad de tejido adiposo. Los resultados de la cuantificación de triglicéridos se presentan en la Figura 14, donde se puede apreciar una diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre el control sano y control obeso. El control obeso presenta el valor mayor de acumulación de triglicéridos en tejido adiposo ( $706.07 \pm 101.7$  mg/g tejido), donde la infusión de pericón presenta una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ) de los triglicéridos de tejido

adiposo, sin embargo, las infusiones de salvia y caléndula no presentan diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) comparadas con el control obeso.

Para ver el comportamiento de la síntesis endógena de triglicéridos hepáticos se realizó la cuantificación de triglicéridos en suero, donde se muestran valores superiores para el control obeso ( $290.54 \pm 5.08$  mg/dL) comparado contra el control sano ( $85.73 \pm 12.18$  mg/dL), además resultados muy interesantes se obtuvieron para los tres tratamientos, donde se observan disminuciones significativas ( $P \leq 0.05$ ) de hasta el 74% de triglicéridos séricos (Figura 15).

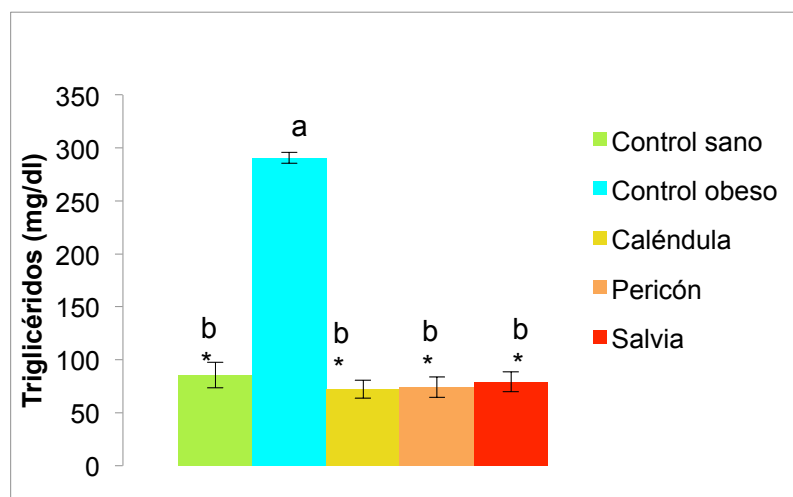


Figura 15. Concentración de triglicéridos séricos en animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE ( $n=3$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

#### VI.4 Evaluación del daño a tejido hepático

##### VI.4.1 Evaluación del contenido lipídico en hígado

Para evaluar la acumulación de lípidos en órganos diferentes a tejido adiposo se cuantificó el contenido de triglicéridos en hígado donde los resultados mostrados en

la Figura 16 indican los resultados para la cuantificación de triglicéridos en tejido hepático, donde no se observan diferencias grandes entre grupos, sin embargo el control sano y obeso presentan diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ).

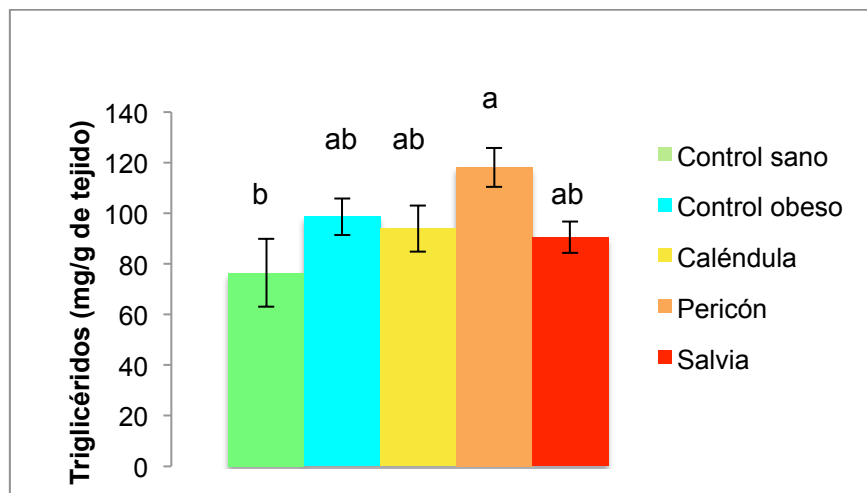


Figura 16. Concentración de triglicéridos en tejido hepático de animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE ( $n=3$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey.

Los grupos de caléndula y salvia presentan valores similares ( $93.89 \pm 9.15$  y  $90.5 \pm 6.13$  mg/g de tejido respectivamente) de triglicéridos en tejido adiposo comparados con el control obeso ( $98.66 \pm 7.29$  mg/g de tejido). Sin embargo el grupo tratado con la infusión de pericón presentó valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) superiores al control obeso.

#### VI.4.2 Determinación de proteínas oxidadas en hígado

Para evaluar el efecto del estrés oxidativo en tejido hepático se cuantificaron los residuos carbonilo en hígado, los cuales son un subproducto de la oxidación de las proteínas. La infusión de caléndula presentó valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores de triglicéridos que el control obeso ( $5.29 \pm 1.59$  contra  $7.31 \pm 0.71$  nmol de restos carbonilo /mg proteína), y comparativamente similares al control sano ( $5.29 \pm 1.59$  contra  $5.23 \pm 0.55$  nmol de restos carbonilo /mg proteína). Similares

resultados se obtuvieron para la infusión de pericón ( $5.50 \pm 1.52$  nmol de restos carbonilo /mg proteína)(Figura 17).

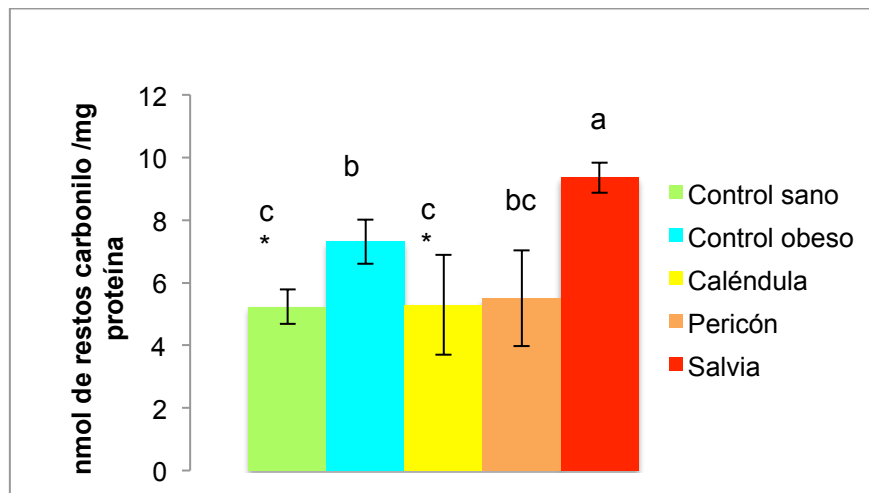


Figura 17. Concentración de residuos carbonilo en tejido hepático de animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b, c</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \*Indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

La infusión de salvia presenta un comportamiento diferente a las demás infusiones, teniendo valores por encima del control obeso ( $9.35 \pm 0.48$  nmol de restos carbonilo /mg proteína).

## VI.5. Presencia de enfermedades crónico degenerativas relacionadas con la obesidad

### VI.5.1. Diagnóstico de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina

Para realizar la evaluación de la intolerancia a la glucosa se realizó una curva de tolerancia a la glucosa, en la que se administra una carga de glucosa y se evalúan los niveles de glucosa sanguínea a diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la Figura 18. Los niveles de glucosa sanguínea para los tres tratamientos

muestran comportamientos similares ( $P \leq 0.05$ ) al control sano, sin embargo al cabo de 120 minutos en grupo tratado con la infusión de salvia es incapaz de regresar a los niveles presentados por las demás infusiones y el control sano. El control obeso presenta un comportamiento de la curva superior a todos los grupos tratados con las infusiones durante el tiempo de la prueba, sin embargo al cabo de 120 minutos, si bien es incapaz de disminuir los niveles de glucosa, presenta valores similares ( $P \leq 0.05$ ) al grupo tratado con la infusión de salvia a éste tiempo evaluado.

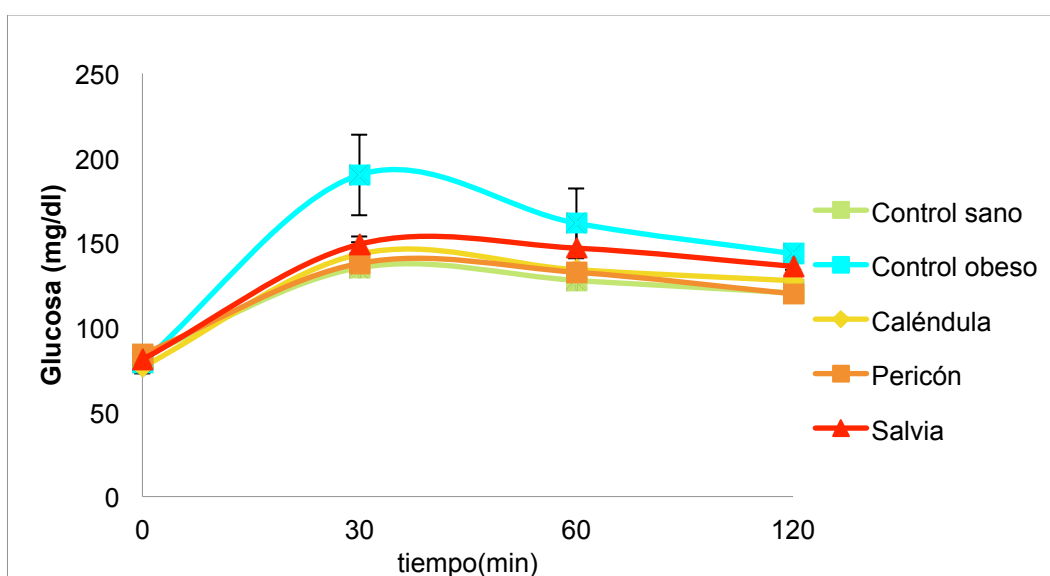


Figura 18. Curva de tolerancia a la glucosa de los animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3).

Para la evaluación de la resistencia a la insulina, se realizó la medición de los niveles de glucosa mediante el ensayo enzimático con la glucosa oxidasa, dichos resultados se muestran en el Cuadro 6. Se obtuvieron niveles similares entre sí de glucosa para los tratamientos con las infusiones de caléndula y pericón ( $92.8 \pm 3.5$  y  $93.6 \pm 11.7$  mmol/dL respectivamente), además son significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control sano ( $72.4 \pm 6.5$  mmol/dL). Interesantemente el grupo tratado con la infusión de salvia al 1% presenta valores elevados de glucosa sanguínea, y son significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control obeso ( $121.2 \pm 12.9$  y  $123.3 \pm 14.5$  mmol/dL respectivamente)(Cuadro 6).

De igual manera se realizó la evaluación de los niveles de insulina en suero por el técnica de ELISA (valores expresados en uU/mL), en la que los niveles de insulina para las infusiones de caléndula y pericón presentan resultados significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control sano ( $18.1 \pm 6.4$  y  $24.2 \pm 4.2$  contra  $24.1 \pm 3.5$   $\mu\text{U/mL}$  respectivamente)(Cuadro 6). Resultados distintos se observan para la infusión de salvia, que tiene niveles superiores a los demás tratamientos, y además, tiene valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control obeso ( $24.2 \pm 4.2$  contra  $48.9 \pm 6.5$   $\mu\text{U/mL}$  respectivamente).

Cuadro 6. Resultados de glucosa e insulina sérica, y cálculo del Homeostasis Model Assessment (HOMA) de animales tratados con infusiones herbales

	Glucosa <sup>1</sup>	Insulina <sup>2</sup>	HOMA <sup>3</sup>
Control sano	$72.4 \pm 6.5^b$	$24.1 \pm 3.5^b$	$4.3 \pm 1.1^c$
Control obeso	$123.3 \pm 14.5^a$	$48.9 \pm 6.5^a$	$16.5 \pm 3.9^a$
Caléndula	$92.8 \pm 3.5^{ab}$	$18.1 \pm 6.4^{b*}$	$3.9 \pm 1.2^{c*}$
Pericón	$93.6 \pm 11.7^{ab}$	$24.2 \pm 4.2^{b*}$	$5.5 \pm 1.4^{bc*}$
Salvia	$121.2 \pm 12.9^a$	$48.9 \pm 9.3^a$	$11.7 \pm 2.5^{ab}$

Los datos son representados como la media  $\pm$  EE (n=5). <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes por columna indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \*Indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  contra el control obeso con la prueba de Dunnet. <sup>1</sup>resultados expresados en mmol/dL; <sup>2</sup>resultados expresados en  $\mu\text{U/mL}$ ; <sup>3</sup> valores expresados en UA unidades arbitrarias.

Por otro lado se realizó el cálculo del índice HOMA (Homeostasis Model Assessment), los resultados se muestran en el Cuadro 6. Los valores de HOMA para los tratamientos con las infusiones de caléndula y pericón ( $3.9 \pm 1.2$  y  $5.5 \pm 1.4$  UA respectivamente) son significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores que el control obeso ( $16.5 \pm 3.9$  UA), y significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control sano ( $4.3 \pm 1.1$  UA). Valores distintos se obtuvieron para la infusión de salvia, que es

significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similar al control obeso ( $11.7 \pm 2.5$  contra  $16.5 \pm 3.9$  UA).

#### VI.5.2. Evaluación del riesgo de enfermedades cardiovasculares

Cuadro 7. Concentración de lípidos en animales tratados con infusiones herbales.

	Colesterol total <sup>1</sup>	c-HDL <sup>1</sup>	c-LDL <sup>1</sup>
Control sano	$111.56 \pm 2.46^{b*}$	$46.97 \pm 0.51^a$	$41.25 \pm 7.26^b$
Control obeso	$192.05 \pm 3.33^a$	$51.47 \pm 0.93^a$	$87.66 \pm 8.46^a$
Caléndula	$118.53 \pm 8.96^{b*}$	$54.33 \pm 1.41^a$	$53.39 \pm 13.95^{ab}$
Pericón	$125.98 \pm 5.28^{b*}$	$56.68 \pm 1.26^a$	$54.44 \pm 6.76^{ab}$
Salvia	$133.33 \pm 7.13^{b*}$	$48.52 \pm 1.07^a$	$68.97 \pm 18.39^{ab}$

<sup>1</sup> Resultados expresados en mg/dL; Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b</sup> Letras diferentes por columna indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \*indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  contra el control obeso con la prueba de Dunnet.

Se realizó la evaluación del perfil lipídico con la medición de los niveles de colesterol total, triglicéridos (Figura 15), c-LDL y c-HDL. Los resultados se muestran en el Cuadro 7. Los resultados de la concentración de triglicéridos se muestran en la Figura 15. Todos los tratamientos presentan una reducción promedio de 39.5% significativa ( $P \leq 0.05$ ) de los niveles de colesterol total comparados contra el control obeso (caléndula  $118.53 \pm 8.96$ , pericón  $125.98 \pm 5.28$ , salvia  $133.33 \pm 7.13$  mg/dL contra control obeso  $192.05 \pm 3.33$  mg/dL). Con respecto a los niveles de colesterol HDL no existe diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos ni grupos control.

Para la evaluación de los niveles de colesterol LDL calculada con la ecuación de Friedewald, se obtuvieron valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores para los tres

tratamientos con una disminución promedio de 32.77%, comparados contra el control obeso (Cuadro 7).

Siendo que el aumento de los niveles de c-LDL resulta en el incremento del riesgo a presentar enfermedades cardiovasculares, se realizó el cálculo del índice aterogénico (IAt), el cual relaciona los el aumento o disminución proporcional de los niveles de c-LDL con respecto a los de c-HDL. Los resultados para el cálculo de IAt se muestran en la Figura 19.

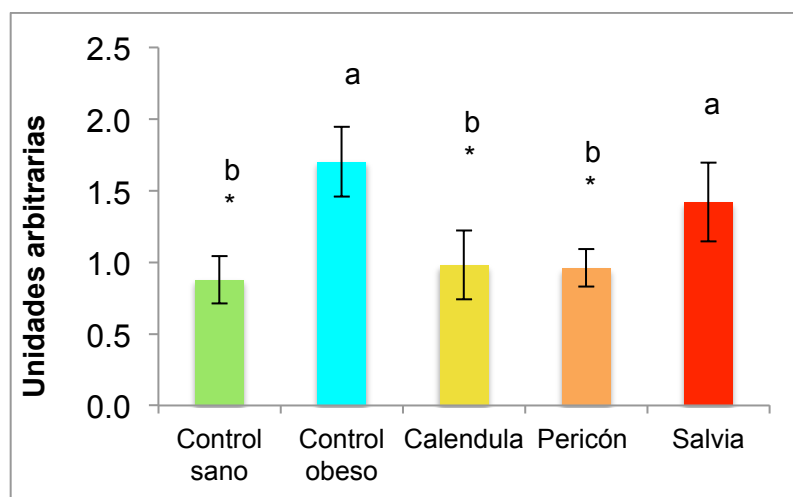


Figura 19. Índice aterogénico (c-LDL/c-HDL) de los animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

Ninguno de los grupos evaluados presenta valores superiores al valor de corte (IAt = 3) para sugerir una mayor propensión a enfermedades cardiovasculares, sin embargo cabe resaltar, que si bien los valores no son elevados una mayor elevación indicaría que el riesgo se puede incrementar, con lo que los valores para las infusiones de caléndula y pericón presentan valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores a aquellos del control obeso ( $0.98 \pm 0.24$   $0.96 \pm 0.12$  contra  $1.70 \pm 0.24$  UA respectivamente) y significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control sano ( $0.87 \pm$



0.16 UA); no siendo así para la infusión de salvia que presenta valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control obeso ( $1.42 \pm 0.27$  UA).

### VI.5.3. Evaluación de daño renal

#### VI.5.3.1. Cuantificación de proteína en orina

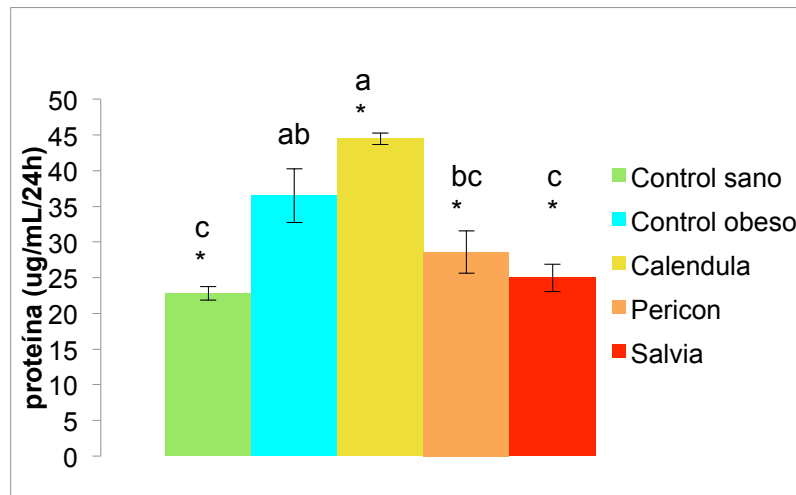


Figura 20. Concentración de proteína en la orina de animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=3). <sup>a, b, c</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* Indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

Se realizó la estimación de el daño renal provocado por una dieta alta en grasa y fructosa, en el que uno de los primeros indicios de daño renal es constituido por los niveles de proteína en orina; los resultados se muestran en la Figura 20. El grupo tratado con la infusión de salvia logró la mayor disminución de los niveles de proteína en orina ( $24.99 \pm 1.93$   $\mu$ g de proteína/mL por 24h) con valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) diferentes al control obeso ( $36.51 \pm 3.77$   $\mu$ g de proteína/mL por 24h), y significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control sano ( $22.79 \pm 0.93$   $\mu$ g de proteína/mL por 24h).

Resultados similares se obtuvieron para el grupo tratado con la infusión de pericón (Figura 20). Resultados diferentes se obtuvieron para el grupo tratado con la infusión de caléndula al 1%, que presenta valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) mayores al control obeso ( $44.45 \pm 0.78 \mu\text{g}$  de proteína/mL por 24h) (Figura 20).

### VI.5.3.2 Determinación de proteínas oxidadas en riñón

De igual manera, se realizó la medición de otro parámetro de daño renal, por medio de la cuantificación de residuos carbonilo en tejido renal de los animales en estudio. Los resultados son presentados en la Figura 21. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ni grupos control.

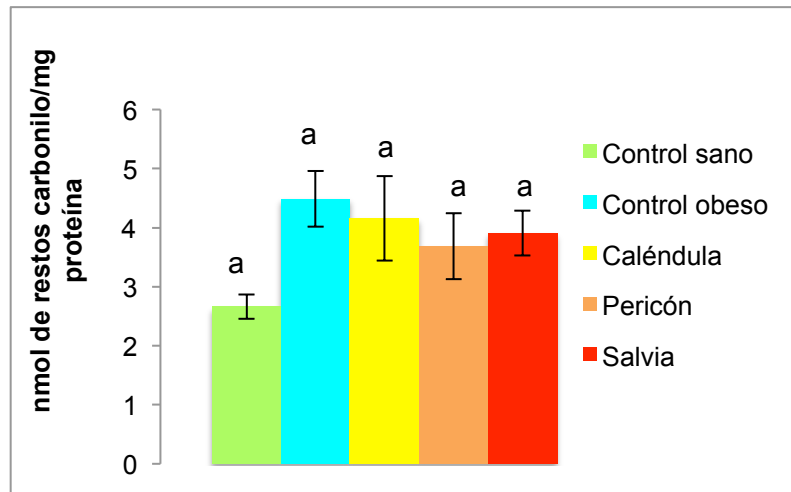


Figura 21. Cuantificación de residuos carbonilo en tejido renal de animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE ( $n=3$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \*Indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnett.

### VI.5.3.3 Peroxidación lipídica en fracción post-mitocondrial (PMS) en tejido renal

A su vez se realizó la evaluación del daño oxidativo a lípidos de membrana de tejido

renal, siendo que éste constituye otro parámetro para la evaluación del daño renal. Una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ) promedio de 44.68% para los tres tratamientos comparados contra el control obeso (caléndula  $137.82 \pm 4.03$ , pericón  $142.36 \pm 13.09$ , salvia  $150.24 \pm 8.65$  nmol TBARS/mg de tejido renal contra control obeso  $259.34 \pm 10.61$  nmol TBARS/mg de tejido renal).

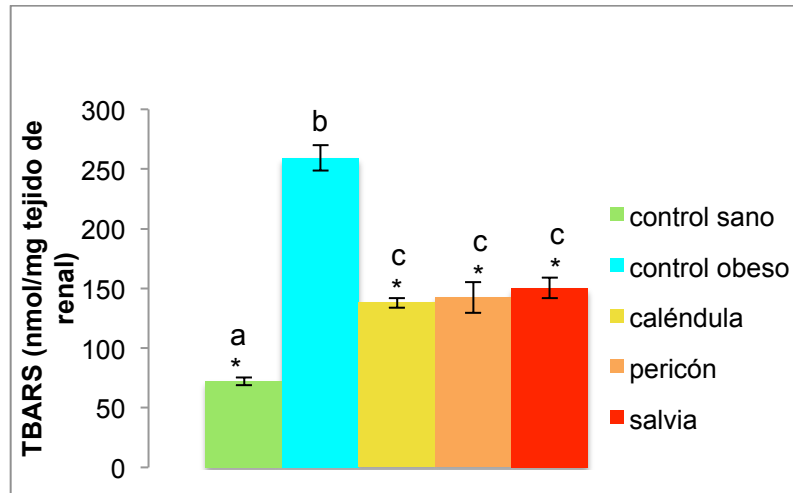


Figura 22. Peroxidación lipídica en fracción post-mitocondrial de riñón de animales tratados con diferentes infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE ( $n=3$ ). <sup>a, b, c</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \*Indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

## VI.6. Evaluación de marcadores de inflamación

Para la estimación del estado inflamatorio de los grupos en estudio, se cuantificaron los niveles de las citocinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína C reactiva (CRP), Leptina y de la citocina antiinflamatoria adiponectina por la técnica de ELISA.

Los niveles séricos de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  se muestran en la Figura 23, donde se puede observar que el tratamiento individual con las tres infusiones tiene un efecto reductor significativo ( $P \leq 0.05$ ) de los niveles de ésta citocina de

hasta 31.46%, comparado contra el control obeso. Cabe resaltar que los niveles de TNF- $\alpha$  para los tres tratamientos son significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control sano.

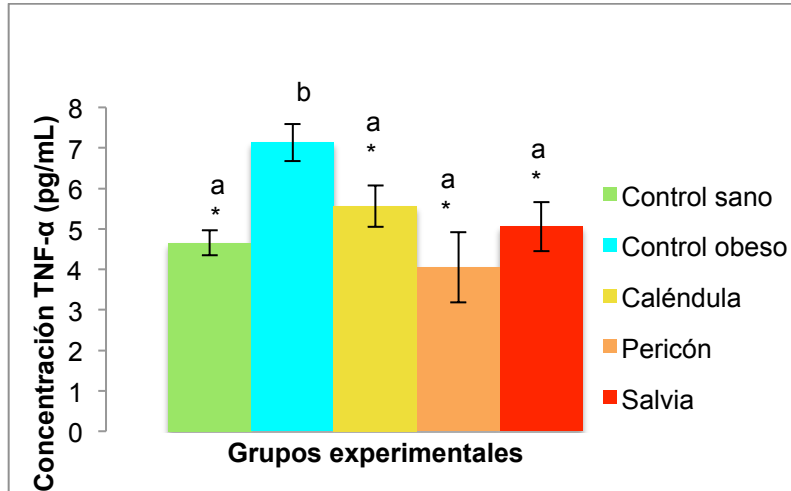


Figura 23. Concentración sérica de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en animales tratados con infusiones herbales. Los datos son representados como la media  $\pm$  EE ( $n=4$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  contra el control obeso con la prueba de Dunnet.

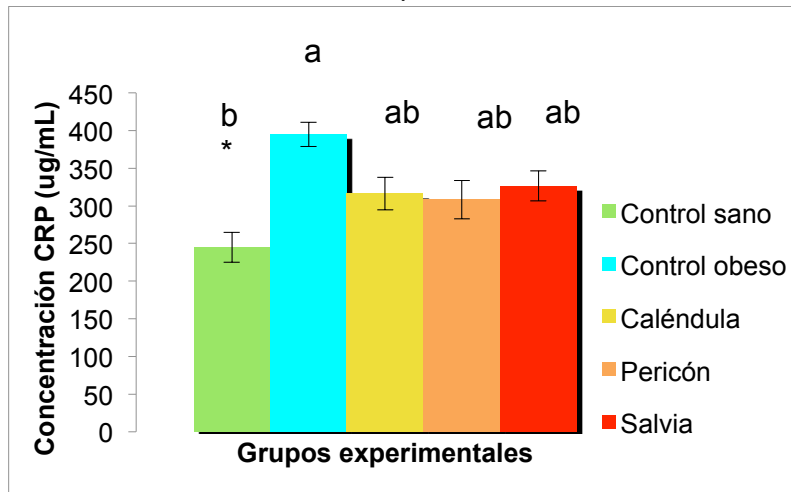


Figura 24. Concentración sérica de proteína C reactiva de los animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE ( $n=4$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

Los niveles de la citocina proinflamatoria CRP se muestran en la Figura 24. Los tres tratamientos presenta una reducción significativa ( $P \leq 0.05$ ) de los niveles de ésta citocina de hasta un 19.69%, contra el control obeso. No existe diferencia estadística significativa entre tratamientos.

De igual manera se evaluaron los niveles de la citocina proinflamatoria leptina, donde se observa una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ) de los niveles séricos de ésta citocina para el tratamiento con la infusión de pericón comparado contra el control obeso ( $1280.37 \pm 274.48$  contra  $1641.71 \pm 206.19$  pg/mL respectivamente), no siendo así para las infusiones de caléndula y salvia ( $1472.87 \pm 314.42$  y  $1737.25 \pm 415.25$  pg/mL respectivamente) que presentan valores significativamente ( $P \leq 0.05$ ) similares al control obeso (Figura 25).

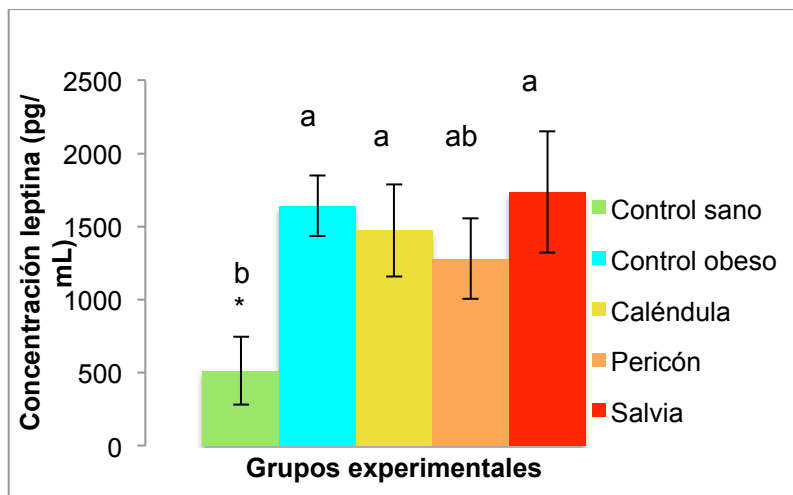


Figura 25. Concentración sérica de leptina en los grupos tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE (n=5). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

Para evaluar la respuesta antiinflamatoria de el organismo al aplicar un tratamiento con infusiones herbales se evaluaron los niveles de la citocina antiinflamatoria adiponectina, evaluada por la técnica de ELISA. Los resultados de adiponectina sérica se muestran en la Figura 26. Los grupos tratados con las tres infusiones

lograron incrementar significativamente ( $P \leq 0.05$ ) su concentración hasta en un 73.18% promedio, comparados contra el control obeso.

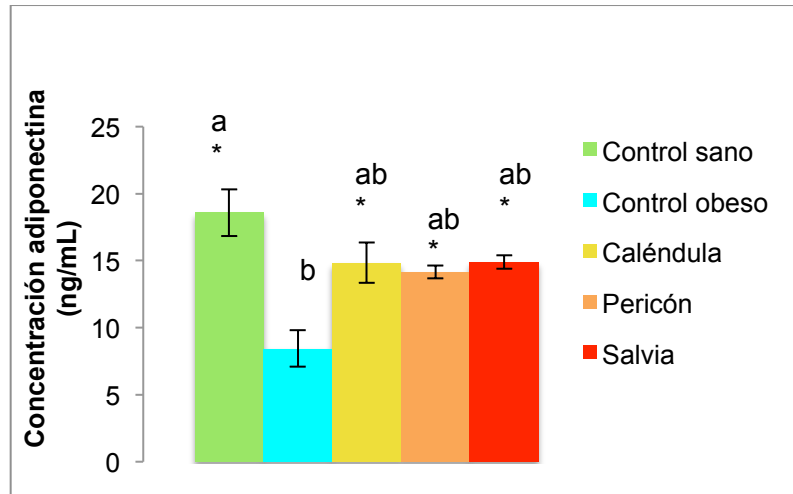


Figura 26. Concentración sérica de adiponectina en animales tratados con infusiones herbales. Los datos se representan como la media  $\pm$  EE ( $n=4$ ). <sup>a, b</sup> Letras diferente indican diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con la prueba de Tukey. \* indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  con el control obeso con la prueba de Dunnet.

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1 Determinación de color y cuantificación de las propiedades antioxidantes de las infusiones de medicina tradicional mexicana

#### VII.1.1. Medición de parámetros de color de las infusiones tradicionales

Se realizó la determinación de parámetros de color mediante las coordenadas L, a\* y b\*, h° y C de las infusiones de *Calendula officinalis* Linn., *Hypericum perforatum* y *Salvia officinalis* preparadas al 1%. Se obtuvieron valores de L\* mayores para pericón y caléndula, lo que indica que son significativamente ( $P \leq 0.05$ ) más luminosos, comparados con el té verde; la infusión de salvia presentó el valor menor de L\* (Cuadro 4), siendo así, la infusión menos luminosa.

La infusión de té verde obtuvo el valor más elevado de a\*, lo que indica una tendencia hacia los tonos rojos; las infusiones de caléndula y salvia obtuvieron valores significativamente menores ( $P \leq 0.05$ ); pero la infusión de pericón presentó el valor más bajo de a\*, lo que indica tonalidades que tienden a colores verdes comparados con las demás infusiones. Esto se confirmó con el valor b\*, ya que la infusión de pericón fue la que presentó el valor más alto, seguido de té verde, caléndula y salvia, lo que indica que hay una tendencia hacia los tonos amarillos para todas las infusiones (Cuadro 4). Los valores h° indican el ángulo de matiz, o el estado puro del color, donde la infusión de pericón obtuvo el valor más elevado, seguido de la infusión de caléndula, y los valores más bajos corresponden a salvia y té verde (Cuadro 4). Estos valores no coinciden con lo reportado por Rivas y colaboradores (2010), lo cual puede atribuirse a la época o lugar de recolección del material empleado para la preparación de las infusiones.

Otro parámetro evaluado fue el croma que corresponde al grado de saturación o pureza del color obteniendo en orden descendente pericón, té verde, salvia y caléndula, sin diferencia significativa entre infusiones ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 4).

Owuor y colaboradores (2005) reportaron que al realizar la evaluación sensorial de una infusión, el consumidor toma en consideración su sabor y color principalmente. Sin embargo, el color puede variar dependiendo de la estación de cultivos ya que presentan variaciones en temperatura, exposición al sol, humedad, etc., lo cual determina la composición química, principalmente con variaciones en el contenido de los polifenoles, especialmente catequinas; de igual manera, la forma de procesamiento de la infusión también genera cambios en el color (Liang, 2004).

#### VII.1.2. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

La elevada concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en una infusión representa un valor agregado que le confiere propiedades nutraceuticas. El mayor contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides (Figura 7 y 8) se observó para la infusión de pericón, seguido de salvia y finalmente la infusión caléndula.

En extractos acuosos se ha reportado que los principales compuestos fenólicos presentes en salvia son el ácido rosmarínico y la luteolina 7-O-glucósido, además contiene ácido hidroxibenzóico, hidroxicinámico, ácido caféico (Koşar y col., 2010; Zimmermann y col., 2011), en extractos de cloroformo y metanol de pericón se han identificado flavonoides como rutina, hiperósido, quercitrina y quercetina (Odabas y col., 2010).

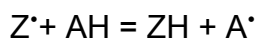
En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio la infusión de pericón presenta valores mayores de compuestos fenólicos y flavonoides, seguido de salvia. Finalmente, la infusión de caléndula tuvo el menor contenido de fenoles y flavonoides. Debido a que estos compuestos están relacionados con actividad antioxidante, por lo tanto sus capacidades antioxidantes fueron evaluadas.



### VII.1.3. Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

#### VII.1.3.1. Reducción del radical libre estable difenil picril hidrazil (DPPH).

Cuando una solución de DPPH se mezcla con otra sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces se forma la especie reducida y estable del radical, con una pérdida del color violeta característico. Se representa al radical DPPH con  $Z^{\bullet}$  y la molécula donadora con AH, cuya reacción primaria es:



Donde: ZH es la forma reducida de DPPH. La estequiometría de la reacción es determinante para la reacción de un radical libre DPPH con un reductor, dando como resultado un DPPH reducido (Molyneaux y col., 2004).

Se obtuvo que la mayor inhibición de la formación del radical DPPH corresponde a la infusión de pericón, seguido de salvia y posteriormente la infusión de caléndula, por lo tanto dichas, infusiones presentan diferentes características reductoras del radical DPPH.

El valor calculado para  $IC_{50}$  es mejor mientras menor sea, ya que significa que se requiere una menor cantidad de infusión para alcanzar la mitad de la inhibición de la reacción. De acuerdo a lo anterior, los valores de  $IC_{50}$  reportados en la Figura 10 coinciden con las concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides reportados en las Figuras 7 y 8, donde pericón, con la mayor concentración de fenólicos y flavonoides presenta el valor menor de  $IC_{50}$ , seguido de las infusiones de salvia y caléndula. Si bien la técnica de reducción del radical libre DPPH no

proporciona datos de su comportamiento *in vivo*, nos pone en perspectiva de lo que podría suceder en sistemas complejos, y debe ser usado como una mera herramienta para obtener un pronóstico del comportamiento de algunos materiales antioxidantes.

#### VII.1.3.2. Inhibición de oxidación de LDL

Otra técnica para evaluar la capacidad antioxidante de extractos herbales consiste en la evaluación de la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Steinberg y colaboradores (1989) demostraron que los compuestos polifenólicos presentes en la dieta mejoran la estabilidad de las LDL, y con ello disminuyen el riesgo a enfermedades cardiovasculares.

La infusión que tiene el mayor porcentaje de inhibición de la reacción de oxidación de LDL fue pericón, lo que indica que tiene un buen comportamiento en sistemas oxidados biológicos (Figura 11).

La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) de las infusiones de pericón y salvia demuestran que poseen buena capacidad de inhibir la formación de malondialdehído y con ello disminuir el riesgo de formación de ateromas (Figura 12). La inhibición de la oxidación de LDL está relacionada con la concentración de compuestos fenólicos (Chang, 2000). Los valores de fenoles totales de las infusiones en orden descendente son pericón>salvia>caléndula. En base a esos resultados se esperaría un comportamiento similar para la capacidad de inhibición y dichos resultados fueron congruentes, ya que la capacidad inhibitoria está relacionada con la concentración de fenoles y flavonoides (Figura 7 y 8).

La oxidación de LDL no sólo está relacionada con enfermedades cardiovasculares, sino que también participan en el desarrollo de enfermedades renales y padecimientos metabólicos (Chang, 2000). Por lo tanto, al realizar un análisis de las

dos capacidades antioxidantes, cada una nos proporciona informaciones diferentes, por ejemplo, en el ensayo de DPPH se evalúa la capacidad de inhibir la oxidación causada por radicales libres, y por lo tanto evita la formación de LDL oxidadas; por un lado la evaluación de la capacidad inhibitoria de la oxidación de LDL nos proporciona información acerca de la capacidad de las infusiones de evitar la formación de radicales y la reacción en cadena de oxidación, y por otro lado sugiere el comportamiento de los antioxidantes en sistemas biológicos complejos como es el uso de LDL humana. Además, esta técnica se relaciona a su vez con la capacidad de disminuir el riesgo cardiovascular ya que la formación de placas ateroscleróticas está intensificada por la oxidación de las lipoproteínas.

## VII.2. Determinación del efecto de las infusiones sobre el desarrollo de la obesidad

### VII.2.1. Peso corporal y consumo de alimento

El control sano registró un aumento del 50% de peso en el transcurso de las 12 semanas, mientras que el control obeso incremento un 55%. Los grupos tratados individualmente con las tres infusiones presentaron un comportamiento similar, sin embargo, solamente las infusiones de pericón y salvia fueron estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 13a). Para los grupos en tratamiento con infusiones herbales, se registró un incremento del peso corporal del 51.9% para los tratamiento con caléndula y pericón, y un incremento del 51.3% para el tratamiento con salvia desde el principio hasta el final del experimento.

El consumo diario de alimento por rata durante todo el experimento fue de  $22.85 \pm 0.35$  gramos promedio para todos los grupos con dieta alta en fructosa y grasa saturada, mientras que para las ratas sanas con dieta base presentaron un consumo promedio de  $31.5 \pm 0.82$  gramos. Se puede observar que el control sano consumió mayor cantidad de alimento durante todo el experimento. Sin embargo, el consumo promedio de grasa saturada por rata presentó una diferencia significativa,

ya que el consumo promedio del grupo sano fue de  $0.92 \pm 0.02$  gramos y para los grupos con dieta alta en grasa saturada se observó un consumo de  $4.73 \pm 0.07$  gramos.

En estudios realizados para evaluar el efecto del té verde sobre la ganancia de peso no se observó una disminución significativa del consumo de alimento entre el grupo tratado con té verde y el control obeso a las 7 semanas de estudio; sin embargo, si se observó una disminución del 6% en el peso corporal (Ito y col, 2008). Resultados similares fueron obtenidos en nuestro estudio ya que se se obtuvieron disminuciones de peso de 7.2% a la semana 12 de tratamiento.

### VII.3. Evaluación microscópica del grado de hipertrofia en adipocitos.

Al incrementar la ingesta calórica y superarse el gasto energético, se produce un aumento en el peso corporal, determinado principalmente por el incremento en la acumulación de grasa en el tejido adiposo, ya sea subcutáneo o visceral, siendo este último un tejido con gran actividad endócrina.

Con el aumento de tamaño del tejido adiposo visceral ocurren dos procesos determinantes en la obesidad, la hipertrofia, que consiste en el aumento del tamaño de los adipocitos, y una hiperplasia, que se define como un incremento en el número de adipocitos. Siendo que el fenómeno de hipertrofia de los adipocitos es un proceso crítico en el desarrollo de la obesidad y su creciente morbilidad, se realizó la evaluación microscópica del tamaño de estas células.

El diámetro promedio de los adipocitos fue significativamente ( $P \leq 0.05$ ) mayor en el grupo obeso comparado con el grupo sano y dicho diámetro fue menor para los tres grupos de tratamiento con una disminución promedio del diámetro de los adipocitos de 25.5% comparados contra el control obeso, teniendo el menor diámetro promedio las infusiones de pericón y salvia (Cuadro 5 y Anexo1). Para los valores

promedios del área de adipocitos hubo diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) del control sano comparado con el control. Los tres grupos con tratamiento de infusiones herbales mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) teniendo una disminución promedio de 41.24% con respecto al control obeso, siendo las infusiones de pericón y salvia las que presentan la mayor disminución contra el control obeso.

Ejaz y colaboradores (2009) proponen un mecanismo de disminución de almacenamiento de grasa por efecto de compuestos naturales como los fenoles, y proponen una inhibición en la diferenciación de los adipocitos y su angiogénesis, ya que para el desarrollo de la obesidad es necesario el crecimiento del tejido adiposo, con lo que se requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que provean oxígeno y nutrientes al adipocito que sufre cambios en el número y tamaño.

Aoki y colaboradores (2007) proponen que ciertos flavonoides presentes en infusiones pueden suprimir la acumulación de grasa en adipocitos y además estimular la lipólisis en ratones C57BL/6J. Además, Monteiro y colaboradores (2008) encontraron que el consumo crónico de té verde con alto contenido de catequinas tiene la habilidad de disminuir el tamaño de adipocitos en tejido adiposo subcutáneo y visceral en ratas Wistar.

Cambios en el peso corporal (Figura 13b) se relacionan positivamente con la disminución del tamaño de los adipocitos, ya que al haber menor tamaño se acumulan menor cantidad de grasa y, por tanto, se tiene una disminución del peso corporal (7.2%).

### VII.3. 1 Evaluación del contenido lipídico en tejido adiposo

Para determinar la acumulación de triglicéridos en los adipocitos, estos fueron evaluados en el tejido adiposo visceral. El contenido de triglicéridos en el grupo

obeso corresponde al valor mayor, mientras que el control sano presentó una concentración significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menor. El tratamiento de caléndula y salvia no presentaron diferencia significativa contra el control obeso, mientras que el grupo tratado con pericón presentó una reducción significativa ( $P \leq 0.05$ ) del contenido de triglicéridos en tejido adiposo visceral (Figura 14). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en el tamaño de los adipocitos (Cuadro 5), ya que el grupo tratado con la infusión de pericón presentó disminución tanto en tamaño como en contenido, pero el contenido de triglicéridos para caléndula y salvia no presenta diferencia comparado contra el control obeso. Esto sugiere una mayor proliferación de adipocitos para almacenar la misma cantidad de grasa, con lo que el tamaño se mantiene pero aumentan en número.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Aoki y colaboradores (2007), quienes sugieren que los flavonoides disminuyen la acumulación de grasa en tejido adiposo, debido a su efecto lipolítico, estimulan la movilización y oxidación de grasas del tejido adiposo. Sin embargo, en nuestro estudio la infusión de pericón fue la que presentó la mayor concentración de flavonoides, 4 veces más que caléndula, pero la concentración de triglicéridos en el tejido adiposo de los animales tratados con estas infusiones fueron similares. Por lo tanto, el efecto reductor de adiposidad posiblemente no está relacionado con la concentración de flavonoides.

Kobayashi y colaboradores (2010) señala que la administración de polifenoles provenientes de extracciones herbales promueven la oxidación de ácidos grasos mediante la expresión de enzimas de  $\alpha, \beta$  y  $\omega$ -oxidación (CPT1A, ACOX2, PHYH y acil-CoA oxidasa/deshidrogenasa), además de la supresión de lipogénesis mediante la inhibición de la expresión de enzimas de síntesis de triglicéridos (DGAT2). Estudios con salvia sugieren la activación de PPAR $\gamma$  como posible mecanismo que estimula la movilización de grasas para su oxidación (Christensen y col., 2010), y la consiguiente disminución de la acumulación.

Se realizó la evaluación del perfil lipídico de los grupos experimentales: triglicéridos, colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y finalmente el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL).

La medición de los triglicéridos presentes en la sangre resulta una medición conveniente para la evaluación de los triglicéridos que están siendo transportados en condiciones de ayuno, es por esto que se realizó la medición de triglicéridos en plasma, donde el control obeso presentó una concentración mayor que el control sano (35.5%). Por otro lado, los grupos de caléndula, pericón y salvia son similares y presentan una reducción promedio de 45.7% comparado contra el control obeso, además tienen valores similares al control sano (Figura 15). Los mecanismos de disminución de triglicéridos en sangre por parte de componentes de las infusiones de caléndula, pericón y salvia no han sido reportados.

Se ha reportado que las dietas altas en fructosa y grasa saturada resultan en un incremento de triglicéridos en plasma (Liang-Yi y col., 2004) sin embargo, el efecto de las infusiones previene el aumento de estos triglicéridos. En enfermedades como la obesidad, niveles elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres causan acumulación lipídica en órganos diferentes al tejido adiposo, incluyendo páncreas, corazón, riñón y paredes de los vasos sanguíneos (Brookheart y col., 2009), y con ello causan disfunción generalizada.

La disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos se debe mayoritariamente a dos mecanismos, ya sea por la regulación de síntesis hepática de novo, o por la disminución en la absorción intestinal. De acuerdo a los resultados reportados para los tratamientos con infusiones (Figura 15), la disminución de triglicéridos en suero posiblemente sean consecuencia de la inhibición de la síntesis hepática.

Estudios reportan un mecanismo molecular responsable donde involucra la inhibición de la expresión génica de varias enzimas, incluyendo acetil-CoA

carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FASn), que están involucradas en la síntesis de triglicéridos en hígado y tejido adiposo, además de la enzima málica que suministra de NADPH para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Seböková y col., 1996).

El segundo mecanismo permite la disminución de triglicéridos, ya sea por la inhibición de la lipasa pancreática o por la regulación del transporte de lípidos intestinal (Agouni y col., 2009; Kianbakht y col., 2011).

#### VII.4 Evaluación del daño a tejido hepático

##### VII.4.1 Evaluación del contenido lipídico en hígado

Cuando el consumo de energía sobrepasa el gasto energético, el exceso de nutrientes es utilizado para la síntesis de grasa en tejido hepático. Para determinar si el menor contenido de triacilglicéridos en tejido adiposo podría estar relacionado con una menor síntesis en hígado, estos lípidos se cuantificaron en este órgano.

El control obeso presentó un valor significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) de triglicéridos que el control sano (Figura 16). Ninguna de las infusiones evaluadas mostró efecto referente a este parámetro evaluado, esto nos indica que no hay diferencias en la síntesis de novo en hígado, por lo tanto no se sintetizan en menor cantidad y la cantidad de triglicéridos en suero puede ser menor (Figura 15) debido a una menor absorción intestinal. Se ha reportado que la salvia disminuye triglicéridos debido a un efecto inhibitorio de la absorción de lípidos y de la lipasa pancreática (Kianbakht y col., 2011).



#### VII.4.2 Determinación de proteínas oxidadas en hígado

La acumulación de grasa en el tejido provoca cambios en estado redox y con ello, produce daños funcionales a macromoléculas como proteínas, lípidos de membrana, y el ADN. El exceso de ERO y ERN por tanto daña la funcionalidad de la célula y la hace incapaz de realizar sus funciones metabólicas (Davies, 1995). Para determinar dicho daño se evaluó la oxidación de las proteínas. Se realizó la cuantificación de residuos carbonilos expuestos en tejido hepático, con lo que se observa el daño oxidativo tisular.

Resultados mostrados en la Figura 17 muestran un aumento significativo de los niveles de residuos carbonilos por parte del control obeso, mientras que el control sano presenta valores menores de oxidación de proteínas, al igual que los grupos tratamiento de caléndula y pericón presentaron disminuciones significativas ( $P \leq 0.05$ ) comparadas contra el control obeso, lo que indica reducción del estado oxidativo hepático.

Davies y colaboradores (1987), señalaron que las alteraciones bioquímicas que producen los radicales libres en las proteínas incluyen oxidaciones de las cadena laterales, fragmentación de la cadena peptídica, formación de enlaces cruzados entre proteínas, modificación de los puentes disulfuro y los puentes de hidrógeno, cambios de conformación, alteración de la hidrofobicidad, y adquisición de otros grupos reactivos como por ejemplo la 3,4-dihidroxifenilalanina, los hidroperóxidos y los carbonilos. Por lo tanto las infusiones de caléndula y pericón ejercen un efecto protector a macromoléculas.

## VII.5. Marcadores de riesgo a enfermedades crónico degenerativas relacionadas con la obesidad

### VII.5.1. Diagnóstico de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina

La intolerancia a la glucosa resulta de la incapacidad de metabolizar la carga glicémica en un determinado lapso de tiempo, esto es debido a un mal funcionamiento de la insulina para internalizar la glucosa. En la obesidad se presenta este padecimiento, por lo que su medición es vital para determinar el riesgo de presentar enfermedades de etiología endócrina.

Para determinar la capacidad del organismo de metabolizar la glucosa exógena se realizó una curva de tolerancia a la glucosa en condiciones de ayuno a las 8 semanas de tratamiento, donde el control obeso demostró un manejo deficiente de la glucosa al presentar un pico hiperglicémico a los 30 minutos y con la consecuente inhabilidad para disminuir los niveles de glucosa hasta los 120 minutos. El tratamiento con la infusión de caléndula y pericón lograron tener comportamientos similares a los del control sano, salvia también mostró efectos importantes en la regulación de la curva de tolerancia a la glucosa (Figura 18).

La incapacidad del organismo para captar glucosa es dependiente de varios factores entre los que destacan la respuesta insulínica del organismo, la resistencia a la insulina y la absorción de carbohidratos en intestino. La respuesta del organismo ante una carga de glucosa debería estimular la producción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas; sin embargo, en varias ocasiones esta respuesta no es la adecuada causando una liberación deficiente de insulina con la consiguiente incapacidad de introducir glucosa a la célula. La resistencia a la insulina es otro de los factores determinantes para la utilización de glucosa, siendo que la insulina resulta vital para ciertas células insulino-dependientes donde el transportador de glucosa se encuentra en el citosol, por lo que través de la señal de insulina se

transporta a la membrana y permite la introducción de glucosa (Liang-Yi y col., 2004).

Finalmente, otro de los factores que determinan el comportamiento de los niveles de glucosa durante una curva de tolerancia es el retraso de absorción de carbohidratos en intestino. Este efecto se ha visto por parte de los polifenoles presentes en infusiones, los cuales secuestran carbohidratos y retrasan su absorción, causando una disminución de la elevación súbita de los niveles de glucosa y prolongando su concentración en niveles normales (Hui, 2009).

Por lo anterior, se realizó la evaluación de los niveles de glucosa sérica en ayuno a las 12 semanas de tratamiento, en la que se observa que los animales obesos presentaron concentraciones de glucosa significativamente más altas ( $P \leq 0.05$ ) que el grupo sano, sin embargo, a pesar de que las infusiones de pericón y caléndula disminuyeron los niveles de glucosa, estas no fueron estadísticamente diferentes. En el caso de la infusión de salvia, el grupo mostró niveles de glucosa muy similares al control obeso (Cuadro 6). Estos resultados no coinciden con lo señalado por Azevedo y colaboradores (2011), ya que encuentran que el constituyente mayoritario de salvia, el ácido rosmarínico, posee propiedades hipoglucemiantes.

Adicionalmente se evaluaron los valores de insulina sérica en ayuno, en la que la concentración de insulina del control obeso fue mayor que el control sano, mientras que los grupos de pericón y caléndula al 1% son similares al control sano, y significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores al control obeso (Cuadro 6). Siendo que en el caso de obesidad se presenta una tendencia a presentar resistencia a la insulina (diabetes tipo 2), el efecto de disminución de insulina resulta ser benéfico.

Para conocer el grado de incapacidad que se tiene para utilizar glucosa se calculó el índice de resistencia insulínica HOMA, en el que a valores más elevados de éste

nos indica una mayor resistencia a la insulina y por tanto incapacidad para introducir glucosa a las células. Los grupos de caléndula y pericón al 1% presentaron valores similares al control sano y ambos grupos presentan diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) comparado contra el control obeso (Cuadro 6).

En un estudio realizado en hombres y mujeres delgados por Adochio y colaboradores (2009), se reporta que dietas altas en carbohidratos (60% carbohidratos) no producen cambios en la señalización de insulina, sin embargo dietas altas en grasa (50% lípidos) resultan compatibles con una reducción de la sensibilidad a la insulina.

Liang-Yi en 2004 reporta efectos benéficos de flavonoides del té verde sobre resistencia a la insulina, en la que se registra un incremento en la translocación de transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT4) en adipocitos, lo que mejora la respuesta tisular a glucosa y disminuye sus niveles plasmáticos (Gomes, 1994). El grupo tratado con la infusión de salvia al 1% presenta valores elevados de HOMA y estadísticamente similares ( $P \leq 0.05$ ) al control obeso. Esto nos dice que este tratamiento en particular no mejora la sensibilidad a la insulina y por tanto el valor de el índice HOMA es elevado y similar al control obeso; sin embargo, la capacidad de los grupos tratados con esta infusión para almacenar triglicéridos en tejido adiposo es similar a los otros tratamientos (caléndula y pericón). Dicho almacenamiento es dependiente del transporte de glucosa al adipocito (Cuadro 6). Por lo tanto, la resistencia a insulina en el caso del tratamiento con salvia podría estar dado básicamente a nivel del músculo. Es importante señalar que si bien el valor de HOMA para esta infusión no es tan elevado, tiene valores similares al control obeso (Cuadro 6).

## VII.5.2. Evaluación del riesgo de enfermedades cardiovasculares

De acuerdo a la evaluación del perfil lipídico presentada en el Cuadro 7, la concentración de colesterol total en el control obeso fue significativamente ( $P \leq 0.05$ ) más elevada, hasta un 50.4% que la del grupo sano. A su vez los tratamientos con las tres infusiones redujeron significativamente el colesterol total ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con el control obeso, siendo caléndula la que registró el mayor porcentaje de reducción con 40.71%, salvia con 38.32% y pericón con 34.40%; sin embargo, entre tratamientos no existe diferencia significativa (Cuadro 7).

Algunos estudios sugieren que los polifenoles pueden reducir la absorción de colesterol debido a interacciones de éstos con los acarreadores y transportadores presentes en la membrana intestinal (Conseil y col., 1998; Leslie y col., 2001).

Con respecto a HDL, los niveles de colesterol HDL no presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el grupo obeso y el control sano, ni entre tratamientos y el control obeso (Cuadro 7).

Un factor de riesgo emergente para la enfermedad coronaria del corazón es la presencia de LDL, principalmente en estado oxidado (ox-LDL), la cual activa monocitos circulantes en el torrente sanguíneo, incrementando su permeabilidad a través del endotelio vascular, lo que constituye el primer paso de la aterogénesis (Cipolletta y col., 2005). Los animales obesos mostraron mayor concentración de LDL, lo que incrementa la probable presencia de ox-LDL. Holvoet y colaboradores (2008) demostraron que concentraciones elevadas de LDL se asocian con el incremento en la incidencia de síndrome metabólico, así como aumento de obesidad abdominal, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Los niveles de colesterol LDL para los tres grupos con tratamiento de infusiones herbales presentan disminuciones significativas ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control obeso (Cuadro 7), sin diferencia estadística significativa entre tratamientos.

Siendo c-LDL un factor de riesgo por su alto contenido de colesterol esterificado, es de vital importancia propiciar una reducción en su concentración, con lo que las infusiones al presentar una disminución promedio de 38.3% podrían reducir la probabilidad de enfermedades cardiovasculares y con ello la presencia de síndrome metabólico. Algunos mecanismos señalan que para la disminución de LDL debe existir una disminución en la absorción de triglicéridos y colesterol intestinal y, por tanto, pueden encontrarse lípidos en las heces (Raederstorff, 2003). Sin embargo, los mecanismos para las infusiones en estudio aún son desconocidos; algunos estudios realizados en humanos revelan que el consumo de té de salvia reduce lípidos sanguíneos disminuyendo la concentración de colesterol total y LDL (Sá y col., 2009).

Tan y colaboradores (2004) usaron el índice aterogénico (IA<sub>t</sub>) para proporcionar mayor información acerca del riesgo que representan los niveles elevados de colesterol LDL circulante y su relación con la formación de placas ateroscleróticas. El IA<sub>t</sub> consiste en la relación de LDL/HDL, donde a valores menores a 3 unidades arbitrarias hay una disminución del riesgo de formación de la placa aterosclerótica, y valores superiores se potencia el riesgo.

Por lo anterior, se realizó el cálculo para determinar el IA<sub>t</sub>. En la Figura 24 se observa un incremento en los animales obesos; sin embargo, éste incremento es menor a las 3 unidades establecidas como valor de corte indicado como marcador de riesgo. Para los grupos de caléndula y pericón al 1% se presentó una disminución significativa comparada contra el control obeso ( $P \leq 0.05$ ). El grupo con tratamiento de salvia no registró diferencias significativas comparado contra el control obeso, pero es significativamente ( $P \leq 0.05$ ) diferente a los demás tratamientos. Al no haber un registro de aumento en el perfil de HDL (Cuadro 6) se podría suponer que no habría un efecto protector; sin embargo, la disminución de LDL representa un decremento en el IA<sub>t</sub> con potencial efecto protector contra riesgo

cardiovascular. Estudios como el de Agouni y colaboradores (2009) registran una disminución del índice aterogénico en un 44.5% debido a la administración de polifenoles provenientes del vino tinto, mientras que en nuestro estudio las infusiones de caléndula y pericón registraron una disminución promedio de 43%, con valores similares al control sano (Figura 19). Es importante resaltar que aunque el IAt para el control obeso no superó las tres unidades, se considera que al incrementarse el valor aumenta el riesgo de formación de ateromas.

### VII.5.3. Evaluación de daño renal

#### VII.5.3.1. Cuantificación de proteína en orina

La prevalencia mundial de obesidad, síndrome metabólico y diabetes es un problema significativo de salud debido a las severas complicaciones médicas que incluyen una disfunción renal severa. La proteinuria es un marcador de daño renal en donde se compromete la permeabilidad del glomérulo, y con ello se permite el paso de moléculas de gran tamaño como lo son las proteínas (Ruggenenti y col., 2004; Amann y col., 2006; de Zeeuw y col., 2006). La cuantificación de la proteína en orina por el método de Bradford resulta útil por la sensibilidad necesaria para su detección.

Los niveles de proteína en orina para los grupos obesos fue mayor comparado con el grupo sano, mientras que los tratamientos de salvia y pericón presentan una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 20).

De acuerdo a lo mencionado por de Zeeuw y colaboradores (2006), la evaluación de los niveles de proteína en orina puede ser indicativo de daño renal, además de ser un signo de riesgo cardiovascular para la población en general, por lo que los tratamientos de pericón y salvia al presentar disminución en la excreción de proteína en orina, conlleva a una disminución del riesgo cardiovascular. Una de las

razones por las que se presentan afecciones renales es por la alteración del estrés oxidativo en riñón, por lo que, una disminución de éste proporciona protección renal. Por lo tanto la mayor concentración de fenoles y flavonoides (Figura 7 y 8) y sus capacidades antioxidantes (Figura 9 y 11) de las infusiones de pericón y salvia podrían estar relacionadas con esta protección renal, mientras que la infusión de caléndula no muestra beneficios (Figura 20).

#### VII.5.3.2. Determinación de proteínas oxidadas en riñón.

Al igual que la acumulación de grasa en tejido hepático presente al haber un exceso en la ingesta calórica, el riñón se convierte en un órgano propenso a la acumulación de grasa, donde estos depósitos favorecen la degeneración del tejido renal, provocando entre otros, una mala filtración glomerular. La presencia de grasa en el riñón provoca que se produzcan radicales libres que dañan proteínas a nivel estructural y funcional. Por tal motivo se realizó la cuantificación de residuos carbonilos en tejido renal, sin embargo, a pesar de presentarse un incremento de estos residuos en los animales obesos, estos no disminuyeron por efecto de tratamiento (Figura 21).

#### VII.5.3.3. Peroxidación lipídica en la fracción post-mitocondrial (PMS) en tejido renal

La evaluación de la peroxidación lipídica en la fracción post-mitocondrial permite conocer el grado de oxidación de grasas dentro de la célula causado por el estrés oxidativo. Para determinar si la oxidación de los lípidos son blancos de protección de las infusiones, los niveles de subproductos de la oxidación de lípidos fueron evaluados en riñón. El control obeso mostró una peroxidación lipídica 5 veces mayor que el control sano. Los valores obtenidos para los tratamientos con infusiones de caléndula pericón y salvia fueron menores comparados con el control obeso, pero superiores al control sano (Figura 22).



Las tres infusiones demostraron *in vitro* un potencial antioxidante importante al inhibir la oxidación de la LDL, por lo tanto compuestos presentes en las infusiones protegen contra el estrés oxidativo, relacionado con moléculas lipídicas, con lo que se reduce el daño al riñón, ya que ambas técnicas (inhibición de oxidación de LDL y peroxidación lipídica en tejido) miden subproductos de la oxidación de lípidos (malondialdehído). Sin embargo esta afirmación no aplica para el tratamiento de caléndula, ya que a pesar de haber presentado el mismo efecto inhibitorio *in vitro*, este no fue suficiente para disminuir alteraciones renales, por lo tanto, algunos mecanismos adicionales deben estar involucrados.

Algunos autores reportan la disminución del daño renal por el consumo de antioxidantes los cuales previenen el daño ocasionado por los radicales libres generados por estrés oxidativo. Otro mecanismo es la inhibición de segundos mensajeros como la proteína cinasa C (PKC) o la ruta de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), factores de transcripción nuclear como NFκB y factores de crecimiento como TGF-β1 a consecuencia de la obesidad (Yamabe y col., 2006).

Los resultados obtenidos en riñón (Figuras 21 y 22) sugieren que las macromoléculas más afectadas son los lípidos, ya que no hay cambios en la oxidación de proteínas. Además, se puede decir que las infusiones de pericón y salvia pueden otorgar protección renal contra el daño oxidativo, causando menor excreción de proteínas en orina que correlaciona con sus actividades antioxidantes (Figura 9 y 11). Contrario a lo esperado, los datos para caléndula indican que hay una disminución en el estado oxidativo renal no dependiente de los compuestos fenólicos (Figura 7 y 8), siendo que las concentraciones de proteína en orina indican un daño, no se puede asumir que el daño es provocado por la infusión misma.

## VII.6. Evaluación de marcadores de inflamación

Teniendo en cuenta la gran variedad de moléculas secretadas por el tejido adiposo, una parte importante la constituyen aquellas relacionados con el proceso inflamatorio, ya que secreta una gran cantidad de mediadores proinflamatorios: TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, inhibidor del plasminógeno tisular 1 (t-PA1), angiotensinógeno, resistina, proteína C reactiva (CRP), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1). Éstos pueden contribuir a la resistencia a la insulina, así como al daño vascular y al desarrollo aterosclerótico asociado a la obesidad, a su vez existen adipocinas antiinflamatorias que previenen este daño como lo es adiponectina (Cachofeiro y col., 2006). Para la evaluación del estado inflamatorio sistémico se midieron los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias leptina, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína C reactiva (CRP), al igual que los niveles de la citocina antiinflamatoria adiponectina.

De acuerdo a la Figura 23, los niveles de TNF- $\alpha$  fueron mas altos para el grupo obeso comparado con el control sano, mientras que los grupos tratados con las infusiones herbales hubo una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ) los tres grupos comparado con el control obeso. Si bien el valor para el control obeso no es indicativo de un estado inflamatorio severo, es conveniente recordar que la obesidad se define como un estado inflamatorio crónico de bajo grado.

En la obesidad TNF- $\alpha$ , es una citocina relacionada con inflamación mediada principalmente por los macrófagos infiltrados en tejido adiposo (Hotamisligil y col., 1994). TNF- $\alpha$  también puede ejercer efectos deletéreos sobre la función vascular a través de diversos mecanismos, uno a través del factor NF $\kappa$ B que estimula la formación de moléculas de adhesión favoreciendo el efecto inflamatorio local, y otro es disminuyendo la disponibilidad de óxido nítrico y con ello alterando la función endotelial, además estimula la producción de proteína C reactiva (CRP) con lo que

puede dañar la pared vascular, favoreciendo, en consecuencia, el desarrollo aterosclerótico (Cachofeiro y col., 2006).

De igual manera, CRP fue cuantificada, y esta proteína inflamatoria también disminuyó para los tres grupos tratados con las infusiones, comparados con el control obeso (Figura 24).

CRP ejerce sus efectos mediante la activación de NFκB, y de esta manera puede favorecer su propia producción, por tanto, CRP y representa un factor de riesgo cardiovascular (Heart Protection Study Collaborative Group, 2011).

El riesgo cardiovascular se puede disminuir al reducir las concentraciones de las citocinas proinflamatorias TNF-α y CRP, por lo tanto se puede decir que los tres grupos con tratamiento de caléndula, pericón y salvia al presentar una reducción promedio de TNF-α hasta de 31.5% y de 19.7% (Figura 23 y 25) para CRP pueden reducir el riesgo a presentar enfermedades cardiovasculares, además de la disminución del colesterol total y triglicéridos (Cuadro 7 y Figura 15).

La Figura 25 muestra los niveles séricos de leptina, donde se observa que el control obeso también incrementó sus niveles con respecto al control sano ( $P \leq 0.05$ ). El grupo tratamiento con la infusión de pericón al 1% presentó una disminución significativa ( $P \leq 0.05$ ), no siendo así para los grupos tratados con las infusiones de caléndula y salvia. Compuestos presentes en infusiones de pericón como el hiperósido, generan una disminución de la inflamación a través de la inhibición de NFκB (Kim y col., 2011).

Se ha reportado a la citocina proinflamatoria leptina como una adipocina reguladora del apetito y el gasto energético, que ejerce su acción a través de una señal que produce al hipotálamo (Allende-Vigo y col., 2010), esto significa que a mayor producción de leptina menor consumo de alimento. Sin embargo, en un estudio

realizado con ratones obesos C57BL/6J registraron incrementos similares de leptina, pero no se observó una asociación con el consumo de alimento, señalando que los niveles de leptina están determinados por la acumulación de grasa y por los niveles de insulina sérica (Aoki y col., 2007), esto coincide con lo encontrado en la Figura 13a.

También se ha reportado que a medida de que el tejido adiposo aumenta en tamaño (acumulación de grasa), los niveles de leptina incrementan de manera desproporcionada, inhibiéndose la respuesta de sus receptores y con ello una resistencia a la leptina (Schling y col., 2002), lo que conlleva a la mala regulación del apetito. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio no señalan una falta de regulación del apetito en el control obeso, siendo el que presenta niveles más elevados de leptina circulante, mientras que los grupos en tratamiento con infusiones presentan el mismo consumo de alimento promedio al control obeso y son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) en los niveles de leptina al control obeso (Figura 25).

La leptina puede actuar, además, en la pared vascular donde puede inducir daño, ya que estimula la producción de endotelina-1 (ET-1) y de especies reactivas del oxígeno, así como de moléculas de adhesión, favoreciendo el desarrollo aterosclerótico (Cachofeiro y col., 2006). Además, Kshatriya y colaboradores en 2010 reportaron que leptina estimula la proliferación y migración de células endoteliales y células del músculo liso, por lo que favorece el desarrollo aterosclerótico y además es capaz de mediar la expresión de colágeno tipo IV y factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que estimula a su vez la producción de especies reactivas de oxígeno, generando la producción de un estado inflamatorio que resulta tóxico para las células epiteliales, mesangiales y endoteliales y con ello fibrosis renal (Guedes y col., 2010). Por lo anterior, se esperaría una disminución del riesgo cardiovascular mediado por la disminución de

leptina para la infusión de pericón al 1%, y no así para las infusiones de caléndula y salvia.

Para realizar la evaluación de la respuesta sistémica del organismo para contrarrestar el estado inflamatorio, se evaluaron los niveles de adiponectina, siendo ésta una citocina antiinflamatoria secretada exclusivamente por el tejido adiposo. Sus niveles plasmáticos se correlacionan inversamente con la obesidad, la enfermedad cardiovascular y la resistencia a la insulina. Los niveles de adiponectina en el control obeso fueron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menores a lo encontrado en los animales sanos. Los valores de adiponectina para los tratamientos incrementaron en promedio un 73.2% con diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) al compararlos contra el control obeso (Figura 26).

Se ha sugerido que la adiponectina presenta acciones antiateroscleróticas, ya que inhibe la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 y la formación de células espumosas (Cachofeiro y col., 2006), con lo que se disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Además, la adiponectina es una adipocina a la cual se le atribuyen propiedades hipoglucemiantes y disminución de ácidos grasos libres (AGL) en ratas alimentadas con dieta alta en grasa (Fruebis y col., 2001). Estos efectos están dados principalmente por la activación de la proteína-kinasa dependiente de AMP (AMPK) que estimula la oxidación de grasas en tejido muscular y la captación de glucosa (Domínguez-Reyes y col., 2007), e inhibe la producción endógena de glucosa con la inhibición de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y G6Pasa (Tomas y col., 2002).

Aumenta la expresión de moléculas que participan en el transporte de ácidos grasos como la CD36, la oxidación de ácidos grasos como la acetil coenzima A carboxilasa y en el gasto energético con la proteína 2 (Yamaguchi y col., 2001). Adicionalmente Sharma y colaboradores en 2008 destacan el papel protector de

adiponectina contra daño renal, en el que señalan que el potencial efecto protector de adiponectina (Alba y col., 2004; Ouedraogo y col., 2006; Tao y col., 2007).

Los mediadores proinflamatorios que son secretados al aumentar el tamaño de tejido adiposo mantienen una acción reguladora negativa de los mediadores antiinflamatorios, siendo que control obeso al tiene el mayor tamaño promedio de adipocitos (Cuadro 5), esto coincide con los niveles elevados de las citocinas pro inflamatorias mostrados en las Figuras 24, 25 y 26.

Cho y colaboradores (2006) mencionan que los niveles de adiponectina son regulados a través de la activación de algunos factores de transcripción (receptor activado por el proliferador de peroxisomas -  $\gamma$  [PPAR- $\gamma$ ], proteína de unión al potenciador de CCAAT  $\alpha$  [C/EBP  $\alpha$ ], homólogo del receptor hepático-1[LRH-1], factor similar al Kruppel 7 [KLF7], y proteína de unión a elementos reguladores de esteroides-1c [SREBP-1c], Forkhead box protein O1 [FOXO1]), que pueden ser modulados por los niveles de citocinas proinflamatorias, por lo tanto, el mecanismo antiinflamatorio debe ser a través de la inhibición de éstos factores.

## IX. CONCLUSIONES

-La infusión de pericón presento la mayor concentración de fenoles y capacidad antioxidante *in vitro*, seguido de salvia y finalmente la de caléndula.

-El contenido de fenoles totales está mas relacionado con la capacidad antioxidante evaluada por el método DPPH, mientras que los flavonoides con la LDL oxidada.

-Todas las infusiones disminuyeron el diámetro del adipocito y el contenido de triglicéridos, siendo mas importante este último efecto para el tratamiento con pericón, lo cual podría estar relacionado con un menor estado inflamatorio.

-La infusión de pericón y caléndula mejoraron la resistencia a insulina

-La disminución de la peroxidación lipídica en riñón no está relacionada con una mejoría en la filtración de proteínas.

-Las infusiones utilizadas en la medicina tradicional para efectos inflamatorios agudos podrían ser utilizadas para disminuir las complicaciones de la obesidad.

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

**Adochio**, R; Leitner, J; Gray, K; Draznin, B; Cornier, M. **2009**. Early responses of insulin signaling to high-carbohydrate and high-fat overfeeding. *Nutrition & Metabolism*. Vol. 6:37

**Agouni**, A; Lagrue-Lak-Hal, H; Mostefai, H; Tesse,A; Mulder, P; Rouet, P; Desmoulin, F; Heymes, C; Martínez, M; Andriantsitohaina, R. **2009**. Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). *Polyphenols and Obesity*. Vol.4: issue 5

**Alba**, G, El Bekay, R; Álvarez-Maqueda, M; Chacón, P; Vega, A; Monteseirín, J; Santa María, C; Pintado, E; Bedoya, F; Bartrons, R. **2004**. Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils. *FEBS Letters*. 573:219.

**Allende-Vigo**, M. **2010**. Adipocytes and Cardiometabolic Risk: Pathophysiology linking adipose tissue and cardiometabolic risk. University of Puerto Rico Medical Sciences Campus.

**Amann**, K; Wanner, C; Ritz, E. **2006**. Cross-Talk between the Kidney and the Cardiovascular System. *Journal of the American Society of Nephrology*. Vol. 17: 2112–2119

**Amini**, Z; Boyd, B; Doucet, J; Ribnicky, D; Stephens, J. **2009**. St. John's Wort inhibits adipocyte differentiation and induces insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 388:146–149.

**Andrade-Cetto**, A. **2005**. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 99: 325–348

**Aoki**, F; Honda, S; Kishida, H; Kitano, M; Arai, N; Tanaka, H; Yokota, S; Nakagawa, K; Asakura, T; Nakai, Y; Mae, T. **2007**. Suppression by licorice flavonoids of abdominal fat accumulation and body weight gain in high fat diet induced obese C57BL/6J mice

**Azevedo**, M; Lima, C; Fernandes-Ferreira, M; Almeida, M; Wilson, J; Pereira-Wilson, C. **2011**. Rosmarinic acid, major phenolic constituent of Greek sage herbal



tea, modulates rat intestinal SGLT1 levels with effects on blood glucose. Molecular nutrition food research. Suppl 1:S15-25.

**Barquera, S;** Campos-Nonato, I; Hernández-Barrera, L; Flores, M; Durazo-Arvizu, D; Kanter,R; Rivera, J. **2009**. Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. Salud Pública de México, vol. 51, sup. 4.

**Blancas-Flores, G;** Almanza-Pérez, J; López-Roa, R; Alarcón-Aguilar, F; García-Macedo, R; Cruz, M. **2010**. Obesity as an inflammatory process. Boletín Médico Hospital Infantil México. Vol. 67

**Brookheart, R;** Michel, C; Schaffer, J. **2009**. As a matter of fat. Cell Metabolism, 10(1): 9–12.

**Cabrera, C;** Reyes-Artacho; Giménez, R. **2006**. Beneficial Effects of Green Tea: A Review. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 25, No. 2, 79–99.

**Cachofeiro, V;** Miana, M; Martín-Fernández, B; de las Heras, N; Lahera, V. **2006**.Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. Revista Española Obesidad. Vol.4 (4): 195-204

**Calero-Sánchez, J;** Faure-García, R; Mitjavila-Cors, M. **2010**.1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and superoxide anion scavenging activity of *Rhizophora mangle* L. bark. Pharmacognosy Research. Vol. 2(5): 279–284.

**Chang, S;** Tan, C; Frankel, E; Barrett, D. **2000**. Low-Density Lipoprotein Antioxidant Activity of Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity in Selected Clingstone Peach Cultivars. Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol. 48: 147–151.

**Cho, S;** Park, P; Shin, H, Kim, Y; Shin, D; Shin, E; Lee, H; Lee, B; Baik, J; Lee, T. **2006**. (-)-Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells. American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism. Vol. 292: 1166–1172.

**Christensen, K;** Jørgensen, M; Kotowska, D; Petersen, R; Kristiansen, K; Christensen, L. **2010**. Activation of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  by metabolites

isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of Ethnopharmacology. Vol. 132(1): 127-33.

**Cipolletta**, C; Ryan, K; Hanna, E; Trimble, E. **2005**. Activation of Peripheral Blood CD14+ Monocytes Occurs in Diabetes. Diabetes. Vol. 54: 2779-2786.

**Conseil**, G; Baubichon-Cortay, H; Dayan, G; Jault, J; Barron, D; Di Pietro, A. **1998**. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal atp- and steroid-binding sites on mouse p-glycoprotein. The National Academy of Sciences. Vol. 95: 9831–9836.

**Davies**, K; Goldberg, A. **1987**. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. Journal of Biological Chemistry. Vol. 262: 8227-8234.

**Davies**, K; Delsignore, M; Lin, S. **1987**. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids. Journal of Biological Chemistry. Vol. 262: 9902-9907.

**Davies**, KJ .**1995** . Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem Soc Symp. Vol. 61: 1-31.

**de Zeeuw**, D; Parving, H; Henning, R. **2006**. Microalbuminuria as an Early Marker for Cardiovascular Disease. Journal of the American Society of Nephrology. Vol. 17: 2100-2105.

**Domínguez-Reyes**, C. **2007**. Adiponectina: El tejido adiposo más allá de la reserva inerte de energía. Revista de Endocrinología y Nutrición. Vol.15: 149-155.

**Ejaz**, A; Wu, D; Kwan, P; Meydani, M. **2009**. Curcumin inhibits adipogenesis in 3t3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. The Journal of Nutrition. Vol.139(5): 919-922.

**Faust**, I. M. **1984**. Role of the fat cell in energy balance physiology. In: Eating and Its Disorders, edited by A. J. Stunkard and E. Stellar: 97–107.

**Folch**, J; Ascoli, I; Lees, M; Meath, J; Lebaron, F. **1951**. Preparation of lipidic extracts from brain tissue. Journal of Biological Chemistry. Vol.191(2): 833-841.

**Friedewald**, W; Levy, R; Fredrickson, D. **1972**. Estimation of the concentration of

low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. Vol.18(6): 499-502.

**Fruebis, J; Tsao, T; Javorschi, S; Ebbets-Reed, D; Erickson, M; Yen, F; Bihain, B; Lodish, H. 2001.** Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *The National Academy of Sciences*. Vol.98: 2005–2010.

**Gomes, A; Vedasiromone, J; Das, M; Sharma, R; Ganguly, D. 1994.** Antihyperglycemic effect of black tea in rat. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol.45: 223–226.

**Guedes, A; Cabrita, A; Pinho, A; Silva, A; Lopes, A; Santos, V; Neves, P. 2010.** Riesgo renal en la obesidad. *Acta Médica Portuguesa*. Vol. 23: 853-858.

**Hausman, G; Wright, J; Dean, R; Richardson, R. 1993.** Cellular and molecular aspects of the regulation of adipogenesis. *Journal of Animal Science*. Vol.71(2): 33–55.

**Heart Protection Study Collaborative Group. 2011.** C-reactive protein concentration and the vascular benefits of statin therapy: an analysis of 20 536 patients in the Heart Protection Study. *Lancet*. Vol. 377: 469–476.

**Holvoet, P; Lee, D; Steffes, M; Gross, M; Jacobs Jr, D. 2008.** Association Between Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein and Incidence of the Metabolic Syndrome. *Journal of the American Medical Association*. Vol.299(19): 2287–2293.

**Hotamisligil, G; Murray, D; Choy, L; Spiegelman, B.1994.**tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *The National Academy of Sciences*. Vol.91: 4854-4858.

**Hui, H; Tang, G; Go, V. 2009.** Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chinese Medicine*. Vol. 4: 11-18.

**Ito, Y; Ichikawa, T; Morohoshi, Y; Nakamura, T; Saegusa, Y; Ishihara, K. 2008.** Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomedical Research*. Vol. 29: 27-32.

**Kaur, G; Jabba, Z; Athar, M; Alam, S. 2005.** Punica granatum (pomegranate) flower extracts possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology. Vol. 44: 984-993.

**Kim, H; Hiraishi, A; Tsuchiya, K; Sakamoto, K. 2010.** (-)-Epigallocatechin gallate suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through transcription factors FoxO1 and SREBP1c. Cytotechnology. Vol. 62: 245–255.

**Kianbakht, S; Abasi, B; Perham, M; Hashem-Dabaghian, F. 2011.** Antihyperlipidemic Effects of Salvia officinalis L. leaf extract in Patients with Hyperlipidemia: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. Phytotherapy Research. Vol. 10. 278-288.

**Kobayashi, Y; Miyazawa, M; Kamei, A; Abe, K; Kojima, T. 2010.** Ameliorative effect of mulberry leaves on hyperlipidemia in rats fed a high fat diet induction of fatty acid oxidation, inhibition of lipogenesis, and suppression of oxidative stress. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol.74(12): 2385-2395.

**Konark Group Ltd. 2011.** [http://konarkgroupindex.com/files/pdf/calendula\\_officinalis.pdf](http://konarkgroupindex.com/files/pdf/calendula_officinalis.pdf)

**Koşar, M; Dorman, H; Başer, K; Hiltunen, R. 2010.** Salvia officinalis L.: composition and antioxidant-related activities of a crude extract and selected sub-fractions. Natural Products Community. Vol. 5(9):1453-1466.

**Kshatriya, S; Liu, K; Salah, A; Szombathy, T; Freeman, R; Reams, G; Spear, R; Villarreal, D. 2010.** Obesity Hypertension: The Regulatory Role of Leptin. International Journal of Hypertension. Vol.11: 200-208.

**Liang, Y; Lu, J; Zhang, L; Wu, S; Wu, Y. 2004.** Estimation of tea quality by infusion colour difference analysis. Journal of Food Science and Agriculture. Vol. 85: 286–292.

**Liang-Yi, W; Chi-Chang, J; Lucy-Sun, H; Yung-Pei, H; Pei-Hsuan, H; Low-Tone, H. 2004.** Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. European Journal of Nutrition. Vol. 43 : 116–124.

**Leslie, E;** Mao, Q; Curtis J. Oleschuk, Roger G. Deeley, And Susan P. C. Cole. **2001**. Modulation of multidrug resistance protein 1 (mrp1/abcc1) transport and ATPase activities by interaction with dietary flavonoids. *Molecular Pharmacology*. Vol.59: 1171–1180.

**Marques, B;** Hausman, D; Martina, R. **1998**. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiol*, Vol. 275:1898-1908.

**Medell, MA;** Patel, P; Ballam, L; Strachan, D; Northfield, TC. **1996**. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross-sectional study. *British Medical Journal*. Vol. 312: 1061-1065.

**Mendoza-Díaz, S. 2010**. IFT 2010 Chicago. Chicago, USA. Vol. 11(6): 130-145.

**Molyneux, P. 2004**. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. Vol.26(2) : 211-219.

**Monteiro, R;** Assunción, M; Andrade, J; Neves, D; Calhau, C; Azevedo, I. **2008**. Chronic green tea consumption decreases body mass, induces aromatase expression, and changes proliferation and apoptosis in adult male rat adipose tissue. *The Journal of Nutrition*. Vol. 234: 2156-2163.

**Morton, G;** Cummings, D; Baskin, D; Barsh, G; Schwartz, M. **2006**. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature Publishing Group*. Vol.443: 289-295.

**Murcia, J;** Hoyos, I. **2008**. Características y aplicaciones de las plantas. <http://www.zonaverde.net/hypericumperforatum.htm>.

**O'Connor, T;** Yang, S; Nicklas, T. **2006**. Beverage Intake Among Preschool Children and Its Effect on Weight Status. *Official journal of the American Academy of Pediatrics*. Vol. 118: 1010-1018.

**Oboh, G;** Henle, T. 2009. Antioxidant and inhibitory effects of aqueous extracts of *Salvia officinalis* leaves on pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain and liver in vitro. *Journal of Medicinal Food*. Vol. 12(1): 77-84.

**Odabas**, M; Camas, N; Cirak, C; Radusiene, J; Janulis, V; Ivanauskas, L. **2010**. The quantitative effects of temperature and light intensity on phenolics accumulation in St. John's wort (*Hypericum perforatum*). Natural Product Community. Vol. 5(4):535-40.

**Orčić**, D; Mimica-Dukić, N; Francišković, M; Petrović S; Jovin, E. **2011**. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. Chemistry Central Journal. Vol.25(5): 34-43.

**Ouedraogo**, R; Wu, X; Xu, S; Fuchsel, L; Motoshima, H; Mahadev, K; Hough, K; Scalia, R; Goldstein, B. **2006**. Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. Diabetes. 55:1840–1846.

**Owuor**, P; Obanda, M; Nyirenda, H; Mphangwe, N; Wright, L; Apostolides, Z. **2005**. The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa. Food Chemistry. Vol. 97: 644–653

**Perichart-Perera**, O; Balas-Nakash, M; Schiffman-Selechnik, E; Barbato-Dosal, A; Vadillo-Ortega, F. **2007**. Obesity increases metabolic syndrome risk factors in school-aged children from an urban school in Mexico city. Journal of the American Dietary Association. Vol.107: 81-91.

**Pi-Sunyer**, F. **2002**. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. Obesity Research. Vol.10: 97-104.

**Preethi**, K; Kuttan, G; Kuttan, R. **2008**. Antiinflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 47:113-120.

**Preethi**, K; Kuttan, R. **2009**. Hepato and reno protective action of *Calendula officinalis* L. flower extract. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 47(3): 163-168.

**Raederstorff**, D; Schlachter, M; Elste, V; Weber, P. **2003**. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. Journal of Nutrition Biochemistry, 14: 326–332.

**Ribeiro, N;** Kramer-Aguiar, L ; Bottino, D; Wiernsperger, N; Bouskela, E. **2009.** Metabolic disturbances linked to obesity: the role of impaired tissue perfusion. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Vol 53(2): 238-245.

**Rivas, K. 2010.** Determinación de la capacidad antioxidante y cuantificación de flavonoides totales de infusiones herbales. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.

**Rivera J,** Barquera S, González-Cossío T, Olaiz G, Sepúlveda J. **2004.** Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutrition Reviews*. 62:149-57.

**Rivera, L;** Moron, R; Zarzuelo, A; Galisteo, M. **2009.** Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 77: 1053–1063.

**Rodríguez-Martínez, G;** Moreno-Aznar, L; Sarría-Chueca ,A. **2010.** Obesidad historia sobre índice de Quetelet y obesidad. *Revista Española de Obesidad*. Vol. 8(1): 34-40.

**Ruggenti, P;** Fassi, A; Ilieva, A; Bruno, S; Iliev, I; Brusegan, V; Rubis, R; Gherardi, G; Arnoldi, F; Ganeva, M; Ene-Iordache, B; Gaspari, F; Perna, A; Bossi, A; Trevisan, R; Dodesini, A; Remuzzi, G. **2004.** Preventing Microalbuminuria in Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 351(19): 1941-1951.

**Sá, C;** Ramos, A; Azevedo, M; Lima, C; Fernandes-Ferreira, M; Pereira-Wilson, C. **2009.** Sage Tea Drinking Improves Lipid Profile and Antioxidant Defences in Humans. *International Journal of Molecular Science*. Vol. 10: 3937-3950.

**Schling, P;** Löffler, G. **2002.** Cross Talk Between Adipose Tissue Cells: Impact on Pathophysiology. *News Physiology Science*. Vol.17: 99-104.

**Seböková, E;** Klimes, I; Gasperikova, D. **1996.** Regulation of gene expression for lipogenic enzymes in the liver and adipose tissue of hereditary hypertriglyceridemic, insulin resistant rats: effect of dietary sucrose and marine fish oil. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol.1303: 56-62.

**Sharma, K;** Ramachandra-Rao, S; Qiu, G; Kataoka-Usui, H; Zhu, Y; Dunn, S; Ouedraogo, R; Hough, K; McCue, P; Chan, L; Falkner, B; Goldstein, B. **2008**. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 118: 1645-1656.

**Stadtman, E. 1992**. Protein oxidation and aging. *Science*. Vol. 257: 1220-1224.

**Stanhope, K;** Schwarz,J; Keim, N; Griffen, S; Bremer, A; y col. **2009**. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 119(5): 1322-1334.

**Steinberg, D.;** Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L. **1989**. Beyond cholesterol. Modification of low- density lipoproteins that increase its atherogenicity. *New England Journal Medicine*. Vol. 320: 915-924.

**Tan, M;** Johns, D; Glazer, B. **2004**. Pioglitazone reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes. *Clinical Chemistry*. Vol.50(7): 1184-1192.

**Tao, L;** Gao, E; Jiao, X; Yuan, Y; Li, S; Christopher, T; Lopez, B; Koch, W; Chan, L; Goldstein, B; Ma, X. **2007**. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation*. Vol. 115: 1408–1416.

**Tijburg, L;** Wiseman, S; Meijer, G; Weststrate, J. **1997**. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*. Vol.135: 37– 47.

**Tomas, E;** Tsao, T; Saha, A; Murrey, H; Zhang, C; Itani, S; Lodish, H; Ruderman, N. **2002**. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl–CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *The National Academy of Sciences*. Vol. 99: 16309–16313.

**Wolfram, S;** Raederstorff, D; Wang, Y; Teixeira, S; Elste, V; Weber, P. **2005**. Teavigo® (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Annals of Nutrition and Metabolism*. Vol. 49: 54-63.

**Yamabe, N;** Yokozawa, T; Oya, T; Kim, M. **2006**. Therapeutic Potential of (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate on Renal Damage in Diabetic Nephropathy Model



Rats. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics. Vol. 319: 228–236.

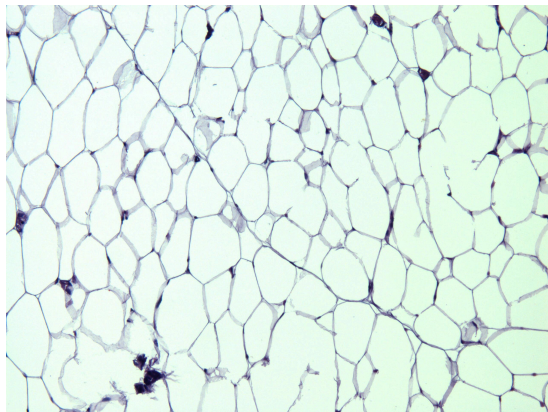
**Yamaguchi**, T; Kamon, J; Waki, H. **2001**. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nature Medicine; Vol. 7: 941-946.

**Zheleva-Dimitrova**, D; Nedialkov, P; Kitanov, G. **2010**. Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. Pharmacognosy magazine. Vol. 6(22):74-78.

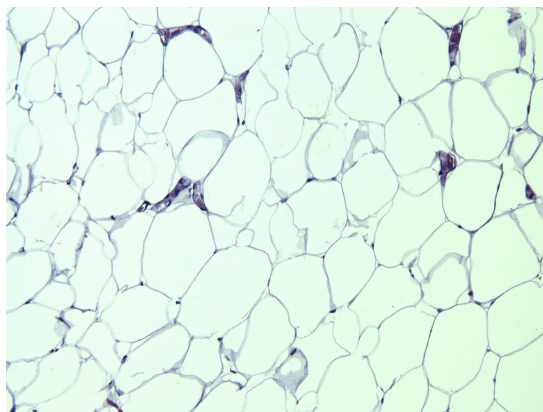
**Zimmermann**, B; Walch, S; Tinzoh, L; Stühlinger, W; Lachenmeier, D. 2011. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. Vol. 879(24): 2459-64.

ANEXOS. Microfotografías representativas de los adipocitos de animales tratados con infusiones herbales y teñidos con hematoxilina eosina 10X. (A) Control sano con dieta estándar, (B) control obeso, (C) grupo tratamiento caléndula 1%, (D) grupo tratamiento pericón 1%, (E) grupo tratamiento salvia 1%. Escala = 100  $\mu$ m.

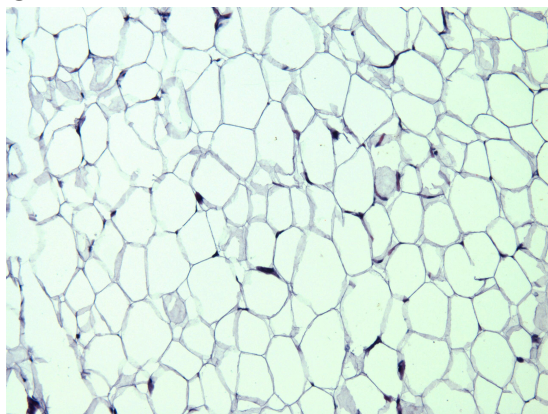
A



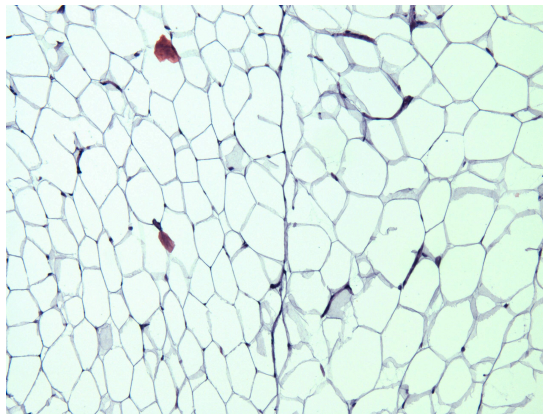
B



C



D



E

