

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“METABOLISMO DE LÍPIDOS HEPÁTICOS EN RATAS
OBESAS Y SU REGULACIÓN POR EL CONSUMO DE
INFUSIONES DE HIERBABUENA (*Mentha piperita* y *Mentha
spicata*) ELICITADAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LUZ MONSERRAT GARDUÑO FONSECA

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Metabolismo de lípidos hepáticos en ratas obesas y
su regulación por el consumo de infusiones de
hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*)
elicitadas

por

Luz Monserrat Garduño Fonseca

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIC-211726



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“METABOLISMO DE LÍPIDOS HEPÁTICOS EN RATAS
OBESAS Y SU REGULACIÓN POR EL CONSUMO DE
INFUSIONES DE HIERBABUENA (*Mentha piperita* y *Mentha
spicata*) ELICITADAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LUZ MONSERRAT GARDUÑO FONSECA

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
DIRECTOR

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
SINODAL

Dra. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ
SINODAL

M. en C. ISIDRO RESENDIZ LÓPEZ
SINODAL

Dedicatoria

A mis padres: **Ricardo Garduño**, por enseñarme que todos los retos que me proponga los puedo llevar a cabo, que el miedo es algo natural pero nunca hay que dejar que este se sobreponga, gracias por todo el apoyo incondicional durante todos estos años, por dejarme decidir y enseñarme a afrontar las consecuencias de esas decisiones. **Juana Fonseca**, gracias por la persistencia en que mantuviéramos una disciplina en los estudios, a manejar las responsabilidades de nuestros actos y a impulsarnos a mejorar constantemente.

A mis hermanos: Gracias por ser un constante modelo de esfuerzo y persistencia durante la universidad. **Fátima**, por permitirme aconsejarte, por todos los momentos buenos y malos que pasamos y pasaremos.

Gracias familia por creer y por el apoyo emocional este proyecto finalmente se concretó, por ayudarme a no dudar de mis habilidades y conocimientos e impulsarme cada día.

Raquel, ya son muchos años juntas y seguimos aprendiendo tantas cosas, gracias amiga por todo el apoyo y cariño y por escucharme en todos los momentos de angustia y felicidad y por siempre encaminarme a crecer. **Belem**, que te puedo decir de este proyecto si tú fuiste pieza clave, sin duda no hubiera sido lo mismo sin tu presencia, sin el apoyo muto, sin aquellas horas e inclusive fines de semana, el agradecimiento que te debo no es solo por ser mi compañera de tesis si no por ser una amiga, gracias por apoyarme a iniciar de cero y por el ánimo constante que ejercías en ese momento tan difícil para mí. **Gaby**, gracias amiga por ayudarme a mantener la calma para poder tomar las mejores decisiones, por ayudarme a enfocar mis metas, por todo el afecto y los buenos momentos. **Marce**, no tengo palabras para describir el profundo agradecimiento que siento, por todos los momentos que laboralmente pasamos y aprendimos juntas, por dejarme conocerte y forjar una amistad tan bonita, gracias por nunca dejarme rendir.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado durante este proyecto.

A la **Dra. Rosalía** Reynoso Camacho, por haberme permitido trabajar en este proyecto, por brindarme su confianza y orientación para poder concluirlo de una forma exitosa además de brindarme las herramientas necesarias durante la licenciatura para tener los conocimientos necesarios para enfrentarme a este proyecto, en el cual desarrollé nuevas técnicas y adquirí nuevos conocimientos los cuales los aprovecharé en mi vida laboral. Gracias por la paciencia y consejos.

A mis sinodales: **Dra. Iza** Pérez Ramírez, por orientarme en el desarrollo y continuación de este proyecto, por tener la paciencia de apoyarnos y enseñarnos las técnicas que empleamos en este proyecto y animarnos constantemente. **Maestro Isidro** Reséndiz, gracias por todos los consejos y orientación desde los primeros semestres de la licenciatura de forma persona y académica.

A la **Dra. Ofelia Mora** Izaguirre, por permitirnos trabajar en su laboratorio para la elaboración de las técnicas de la cuantificación de los genes involucrados en la esteatosis hepática no alcohólica.

A la **M. en C. Laura González** Dávalos, por la orientación y consejos para llevar acabo las técnicas genéticas que se desarrollaron para este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Obesidad	1
1.2 Complicaciones de la Obesidad	1
1.3 Esteatosis hepática	3
1.3.1 Epidemiología	3
1.3.2 Mecanismos involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática asociada a la obesidad	3
1.4 Causas de la obesidad en México	8
1.5. Bebidas funcionales como alternativa contra la obesidad	9
1.6. Hierbabuena	11
1.7 Mecanismos de defensa	13
1.8 Elicitores	14
1.8.1 Ácido Salicílico	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GENERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1 MATERIALES	19
4.1.1 Material vegetal	19
4.1.2 Material biológico	19
4.2 MÉTODOS	19
4.2.1 Inducción de las hierbabuenas con ácido salicílico	19
4.2.2 Evaluación del efecto de la ingesta de infusiones sobre la esteatosis hepática no alcohólica.	20

4.2.3 Cuantificación de triglicéridos en suero	21
4.2.4 Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico sobre la esteatosis hepática	21
4.2.4.1 Análisis histológico del tejido hepático	21
4.2.5 Triglicéridos en hígado	22
4.2.6 Evaluación del mecanismo de acción de la esteatosis hepática	22
4.2.6.1 Cuantificación de triglicéridos en heces fecales	22
4.2.6.2.1 Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADN a partir de tejido de hígado	23
4.2.6.2.2. PCR en tiempo real	23
4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1 Efecto sobre el peso corporal de las infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) tratadas con ácido salicílico 2 Mm	25
5.2 Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) elicitada con ácido salicílico 2 mM sobre la concentración de triglicéridos séricos	27
5.3 Cuantificación de triglicéridos en heces	28
5.4 Concentración de triglicéridos y el grado de esteatosis en hígado	29
5.5 Expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en tejidos de hígado de ratas obesas inducidas con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.	32
6. CONCLUSIONES	36
7. REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Infusiones más consumidas en México según la Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares, 2013.	11
2	Contenido nutrimental de las dietas estándar y alta en grasa y fructosa	20
3	Grupos de los estudio <i>In vivo</i> para la evaluación de las infusiones de hierbabuena tratadas con ácido salicílico	21
4	Oligonucleótidos usados para el análisis de PCR en tiempo real en muestras de tejido hepático	24
5	Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) elicidadas con ácido salicílico 2 mM sobre el contenido de triglicéridos séricos en ratas macho Wistar obesas	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 5 a 11 años de edad	2
2	Consecuencias del desequilibrio energético	4
3	Síntesis hepática normal de triglicéridos y VLDL	5
4	Fisiopatología de la HGNA	8
5	Patrón diario de consumo de bebidas en adulto mexicanos en el 2006	10
6	Variedades de hierbabuena	12
7	Efecto del consumo de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) sobre la ganancia de peso de ratas macho Wistar obesas	26
8	Efecto del consumo de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) sobre la cuantificación de triglicéridos en heces de ratas macho Wistar obesas	28
9	Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>) sobre el contenido de triglicéridos en hígado de ratas macho Wistar obesas	30
10	Identificación de esteatosis hepática	31
11	Cuantificación de mRNA de <i>Acaca</i> (A) y <i>Srebp-1c</i> (B) en hígado de ratas con obesidad inducida y tratadas con infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>)	33
12	Cuantificación de mRNA de <i>CPT1a</i> (C) y <i>Acadm</i> (D) en hígado de ratas con obesidad inducida y tratadas con infusiones de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>)	35

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad multifactorial en la cual se aumenta los niveles séricos de ácidos grasos libres y triglicéridos acumulándose en tejido hepático, inhibiendo su oxidación e incremento en la síntesis de estos, generando esteatosis hepática no alcohólica. En México, uno de los principales factores relacionados con esta enfermedad es el consumo de bebidas con alto contenido calórico. Las infusiones herbales presentan compuestos bioactivos que pueden incrementarse cuando las plantas son elicidadas. En este proyecto se evaluó el efecto de las infusiones de hierbabuena elicitada sobre el control de la esteatosis hepática en un modelo de obesidad. Se trabajó con dos variedades de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) las cuales fueron elicidadas con ácido salicílico 2 milimolar. Se observó que las infusiones de hierbabuena al 1% no tienen efecto en el peso corporal pero si en los triglicéridos en suero, afectando la absorción intestinal de ácidos grasos. Ambas variedades disminuyeron los triglicéridos en hígado, siendo la infusión de *Mentha spicata* la que presentó mayor efecto el cual coincidió con el nivel de esteatosis, donde la protección fue mayor con infusiones elicidadas. La disminución de triglicéridos se relacionó con la inhibición de la expresión de genes que codifican para la proteína de unión al elemento de esteroil y acetil CoA carboxilasa. Las infusiones no incrementaron la expresión de genes relacionados con la beta oxidación como la carnitina palmitoil transferasa y la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media. Las infusiones de *Mentha spicata* puede ser una alternativa para el control de la esteatosis.

1. ANTECEDENTES

1.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial, que suele caracterizarse por el aumento de tejido adiposo, el cual es originado por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético. Este exceso de energía es almacenado en forma de triglicéridos en el tejido adiposo generando que los adipocitos aumenten en tamaño y número. Estos cambios aumentan el factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas (Manzur y col., 2010). Esta enfermedad suele iniciarse en la infancia y la adolescencia, en la actualidad es un importante y creciente problema de salud pública. Es importante resaltar que la obesidad es diferente al sobrepeso, esta diferencia se puede realizar mediante el uso del parámetro IMC (índice de masa corporal), el cual se calcula dividiendo el peso de la persona en kilos por el cuadro de su estatura (altura) en metros. De acuerdo a la OMS (Organización Mundial de la Salud) define que el sobrepeso para adultos es cuando el IMC es igual o superior a 25 Kg/m² y para obesidad el IMC deberá ser igual o superior a 30kg/m² (OMS, 2000).

En las últimas tres décadas la prevalencia de sobrepeso y obesidad ha tenido un aumento sin precedente y su velocidad de incremento se ve reflejado al colocar actualmente a México en segundo lugar en obesidad en adultos y en primer lugar de obesidad infantil a nivel mundial (NOM-008-SSA3-2010). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), la prevalencia del sobrepeso y obesidad en adultos de 20 años y más fue de 72.5% en el año 2016, las prevalencias tanto de sobrepeso como de obesidad fueron más altas en el sexo femenino. Las prevalencias combinadas de sobrepeso y obesidad en zonas urbanas fue de 72.9% y en zonas rurales de 71.6% (Figura 1) (ENSANUTMC 2016).

1.2 Complicaciones de la Obesidad

Dependiendo de la edad y la etnia, la obesidad se asocia con una disminución de la esperanza de vida, de entre 6 y 20 años (Moyer, 2012). A nivel mundial, cada año

mueren un mínimo de 2.8 millones de personas adultas a causa de la obesidad y el sobrepeso (OMS, 2006). Se estima que el incremento de 15 kg de peso corporal aumenta el riesgo de muerte temprana aproximadamente en un 30% (Franco, 2010). Estos incrementos en mortalidad son atribuibles a las complicaciones de la obesidad como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión arterial, entre otras. Por ello resulta evidente que la obesidad sea catalogada como un importante factor de riesgo como las dislipidemias para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, esteatosis hepática no alcohólica, entre otras (Cabrerizo, 2008).

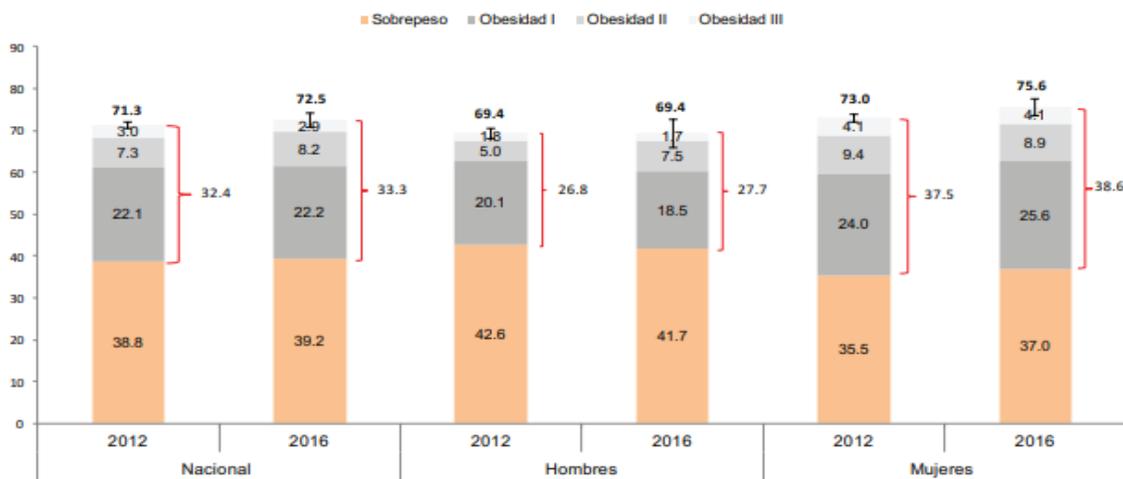


Figura 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años de edad (ENSANUT 2012 y ENSANUTMC 2016)

El desequilibrio energético en la obesidad produce un exceso de lípidos y glucosa circulante en el flujo sanguíneo los cuales son tomados por el páncreas, hígado y tejido adiposo, estas exposiciones en exceso provocan disfunción celular generando un aumento en la circulación de ácidos grasos libres. La exposición de los hepatocitos al exceso de grasas e hidratos de carbono produce esteatohepatitis no alcohólica y resistencia a la insulina (Ferranti y Mozaffarian, 2008) (Figura 2).

1.3 Esteatosis hepática

1.3.1 Epidemiología

El hígado desempeña un papel central en el metabolismo de lípidos, captando los ácidos grasos libres del plasma (AGL), los cuales cuando no son aprovechados como fuente energética mediante oxidación son almacenados (Figura 3), esta alteración es ocasionado por la activación de vías como la lipogénesis de novo la cual genera compuestos como el malonil-CoA en exceso provocando la inhibición de otras vías como la β -oxidación la cual no logra compensar la oxidación de ácidos grasos que se encuentran en exceso, también el VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) se ve afectado por estas liproteínas que generan una disminución significativa de esta proteína generando que los triglicéridos no sean secretados del hígado. La afectación en estas vías que se encargan de oxidar, metabolizar y secretar a los triglicéridos al ser inhibidas o disminuidas provocan un aumento en la acumulación de estos en los hepatocitos generando la esteatosis hepática no alcohólica (Choi y Diehl, 2010).

El hígado graso no alcohólico (HGNA) o esteatosis hepática no alcohólica se caracteriza por la acumulación excesiva de triglicéridos en más del 5% de los hepatocitos. Es una enfermedad asintomática consecuencia de múltiples factores de riesgo como el sobrepeso, obesidad central, dislipidemia, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2; enfermedades asociadas con el síndrome metabólico, el cual provoca complicaciones tanto hepáticas, como cardiovasculares, por lo que el diagnóstico es de crucial importancia dado que este exceso de lípidos puede progresar con inflamación, fibrosis, cirrosis y sus complicaciones (Castro y Silvia, 2015).

1.3.2 Mecanismos involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática asociada a la obesidad

La resistencia a insulina (RI) y la obesidad, principalmente del tipo visceral son factores que generan una afluencia de ácidos grasos libres (AGL) al hígado, induciendo una mayor síntesis de triglicéridos hepáticos (Hernando y Foncillos, 2010).

La RI es un factor primordial en el desarrollo y progresión de la esteatosis hepática, en la cual se origina un aumento del flujo de AGL al hígado, mediante la reducción del efecto supresor de la lipólisis por insulina en el tejido adiposo. En el HGNA, como en otros modelos de RI, el hígado se hace resistente a la acción de la hormona, incrementando la gluconeogénesis y la glucogenólisis mientras que, por el contrario, responde a la hiperinsulinemia aumentando la transcripción de los genes lipogénicos. El aumento en la producción de glucosa hepática acoplada a su menor captación periférica acentúa la hiperglucemia e incrementa la secreción de insulina, aumentando todavía más la lipogénesis hepática. Sin embargo, no está claro si la RI hepática es la causa o la consecuencia de la esteatosis. Algunos estudios señalan una asociación entre el HGNA y la RI, ya que el decrecimiento de los TG hepáticos se correlaciona con la mejora de la sensibilidad a la insulina (López y Martínez, 2014).

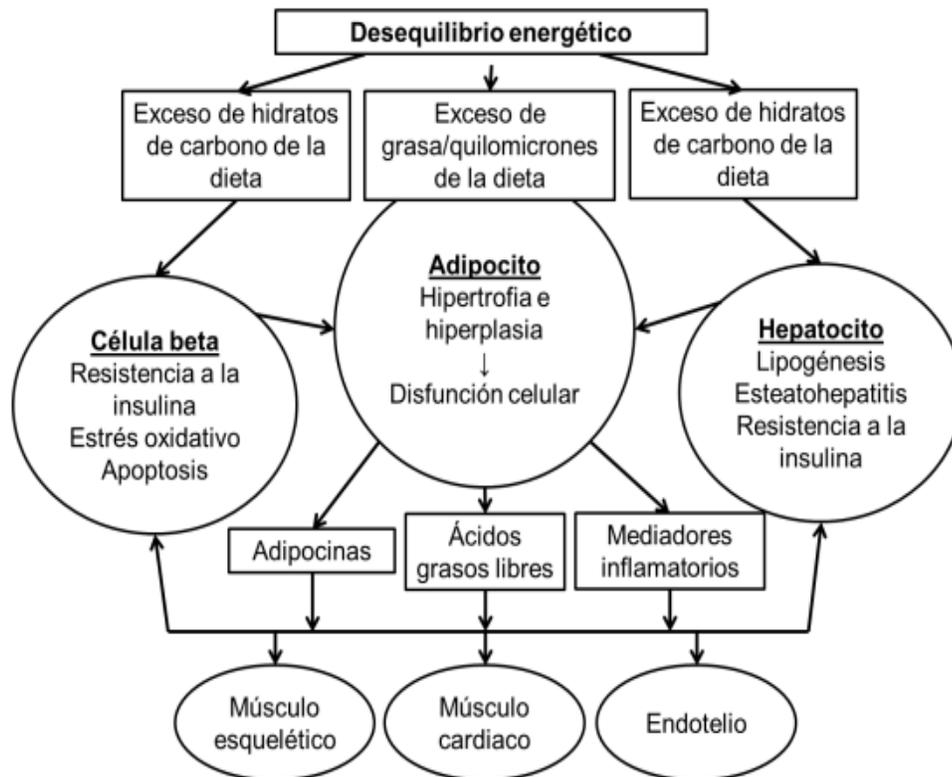


Figura 2. Consecuencias del desequilibrio energético (Adaptado de Ferranti y Mozaffarian, 2008).

1.3.2 Mecanismos involucrados en el desarrollo de esteatosis hepática asociada a la obesidad

La resistencia a insulina (RI) y la obesidad, principalmente del tipo visceral son factores que generan una afluencia de ácidos grasos libres (AGL) al hígado, induciendo una mayor síntesis de triglicéridos hepáticos (Hernando y Foncillos, 2010). Este aumento de triglicéridos en el hígado puede producirse por alguna de las siguientes causas: el incremento de la lipogénesis *de novo*, el aumento de los AGL provenientes de la dieta y la disminución de la β -oxidación de los AG y/o de la secreción de triglicéridos (TG) en forma de VLDL (López y Martínez, 2014).

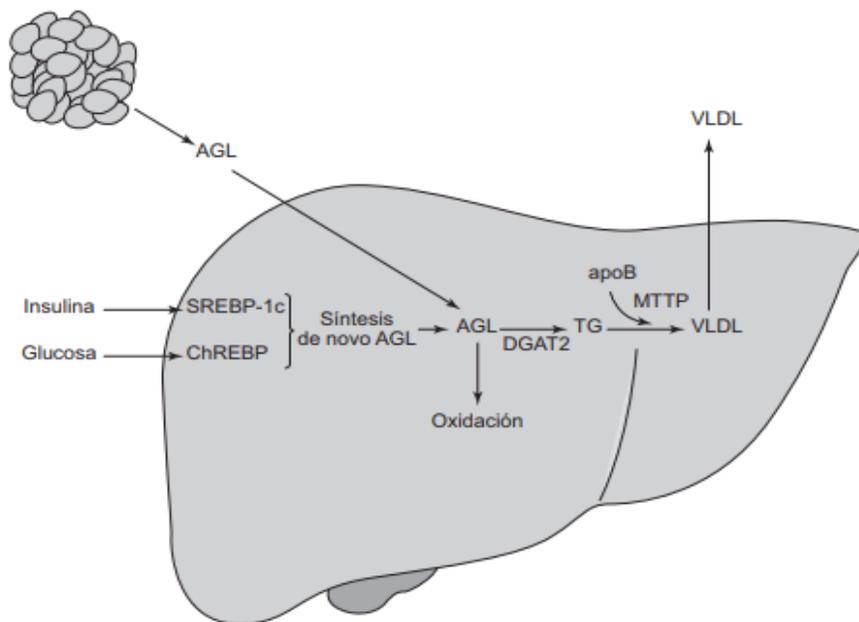


Figura 3. Síntesis hepática normal de triglicéridos y VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad). El contenido en lípidos de hígado viene determinado por el equilibrio de varios procesos: a) Importación de ácidos grasos libres (AGL) del tejido adiposo, b) Síntesis de novo de AGL en hepatocitos, c) Beta-oxidación de los AGL, d) Esterificación de los AGL en TG (triglicéridos) mediado por la DAGT2 (diacilglicerol O-aciltransferasa 2) y e) Exportación de triglicéridos como VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) (Choi y Diehl, 2010).

a) Lipogénesis *de novo*

Esta vía sintetiza AG a partir de carbohidratos provenientes de la dieta, los cuales se encuentran de forma excesiva. En el HGNA el aumento de la glucemia e hiperinsulinemia derivadas de la RI favorecen de forma sinérgica la síntesis de AG a partir de glucosa, generando el aumento de expresión de las enzimas glucolíticas y lipogénicas mediante la activación de los factores de transcripción Srebp-1c (proteína de unión al elemento del estero), ChREPB (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) y LXR (receptor X hepático) los cuales aumentan la infiltración de grasa en el hígado (Fabrini y col., 2010; Ferré, 2002).

Los AG que no son incorporados a los triglicéridos deben ser metabolizados mediante oxidación en las mitocondrias, peroxisomas y microsomas (Figura 4); sin embargo, la activación de Srebp-1c incrementa la expresión de enzimas como la acetil-CoA carboxilasa (ACC1), la cual producirá malonil-CoA a partir de la Acetil-CoA la cual proviene del piruvato de la glucólisis. La enzima ACC1 es la primer enzima limitante de la lipogénesis *de novo*. Al aumentar el malonil-CoA se inhibe la oxidación de los AG, por lo que estos AG sirven de sustrato para la síntesis de triglicéridos hepáticos y la formación de la VLDL (Figura 5). El receptor Srebp-1c es inducido por insulina (Duvnjaky col., 2007).

b) Oxidación de los ácidos grasos

Las mitocondrias son el sitio principal para la oxidación de los AG en plasma o los triglicéridos asociados a las lipoproteínas. Esto implica que son necesarios varios pasos de transporte antes de oxidar los ácidos grasos. Las proteínas transportadoras de los ácidos grasos (FATP) son proteínas transmembrana integrales que mejoran la internalización de ácidos grasos en las células. Los FATP tienen una actividad de acil-CoA sintetasa, lo que sugiere que los AG se convierten rápidamente en acil-CoAs después de la translocación a través de la membrana plasmática; sin embargo, esta es impermeable a los acil-Coa, por lo que para su importación a las mitocondrias se utiliza la lanzadera de carnitina (Doerge y Stahl 2006).

El primer paso de la lanzadera se realiza mediante CPT₁ (carnitina palmitoil transferasa I) el cual sintetiza una acilcarnitina a partir de una acil-CoA. Hay dos isoformas: CPT_{1A} (gen CPT_{1A}), el cual se expresa principalmente en el hígado y CPT_{1B} que está altamente expresada en corazón. Ambas proteínas están presentes en la membrana externa y son sensibles a la inhibición por malonil-CoA (Van der Leij y col., 2000; Ramsay y col., 2001; Bonnefont y col., 2004). Los acil-CoA en las mitocondrias se degradan en unidades de acetil-CoA por medio de cuatro reacciones enzimáticas llamadas β-oxidación, la cual es la vía dominante de metabolización de los AG de cadena corta, media y larga. La primer reacción se lleva a cabo por la deshidrogenación de un acil-CoA-éster para producir un trans-2-enoil-CoA por medio de la enzima Acil-CoA deshidrogenasa, a este paso le sigue la hidratación del doble enlace por la Enil-CoA hidratasa, generando L-3- hidroxil-acil-CoA. En el tercer paso este producto resultante se oxidará por medio de la β-hidroxi-butiril-CoA con NAD⁺ formando 3-ceto-acil-CoA para finalmente llevarse a cabo la tiólisis generando una acil-CoA y dos carbonos en forma de acetil CoA, que pueden ingresar al ciclo de Krebs y coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) que pueden ingresar a cadena respiratoria (Houten y Wanders, 2010).

El acil-CoA resultante entra en otro ciclo de la FAO, el cual emplea enzimas de acuerdo al tipo de cadena resultante del acil-CoA. Los de cadena media son metabolizados en la matriz mitocondrial por la acil-CoA-deshidrogenasa de cadena media (MCAD), la cual es codificada por el gen ACADM, un daño en este gen genera una reducción o eficacia en la actividad de la encima MCAD provocando que los ácidos grasos de cadena media se metabolicen parcialmente y estos se puedan acumular en los tejidos, principalmente hígado y cerebro (Houten y Wanders, 2010).

c) Secreción de VLDL

El hígado secreta a los triglicéridos en forma de partículas VLDL, que son transportadas hacia los tejidos periféricos y después de liberar triglicéridos por medio de la enzima lipoproteínlipasa (LPL) se forman lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), IDL a su vez genera lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los pacientes con

HGNA presentan una sobreproducción de VLDL en comparación con sujetos sanos (Adiels y col., 2006). Debido al aumento de TG, la apolipoproteína-B100 (apo-B100) no se degrada y la expresión de la proteína de transferencia microsómica (MPT) se eleva a consecuencia de la sostenida localización de FoxO1 (forkhead box-O1) en el núcleo, lo que favorece el aumento de la trigliceridemia observada en estos pacientes. Sin embargo, aunque la exposición crónica a insulina induce mayor producción de VLDL (Figura 4), el incremento de su secreción no compensa la excesiva formación de TG, manteniéndose la esteatosis (Choi, y Ginsberg, 2011).

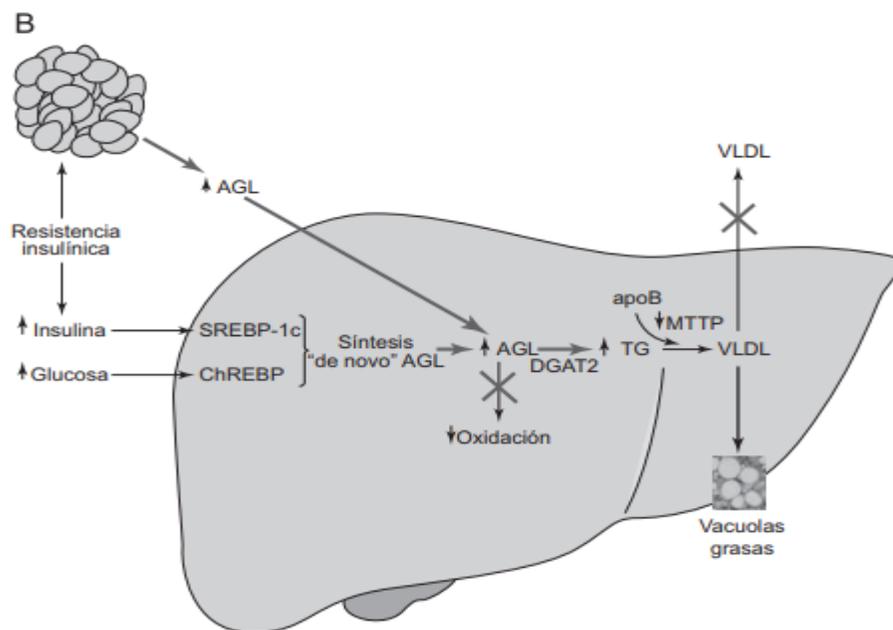


Figura 4. Fisiopatología de la HGNA (Hígado graso no alcohólico). La resistencia insulínica conduce a la acumulación de lípidos en el hígado por varios mecanismos. En el tejido adiposo, la resistencia a la insulina aumenta la lipólisis de triglicéridos en tejido adiposo se incrementa los niveles circulantes de estos e inhibe su beta-oxidación (Choi y Diehl, 2010).

1.4 Causas de la obesidad en México

La obesidad es una enfermedad multifactorial, siendo la principal causa el desequilibrio energético entre las calorías consumidas y gastadas resultado del

aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos (ricos en grasa, sal y azúcares) y un descenso en la actividad física.

La transición nutricional que experimenta el país tiene como característica una occidentalización de la dieta (Cecchini y col., 2010). Y entre los hábitos se encuentra: 1) un aumento de la disponibilidad de alimentos procesados de bajo costo los cuales contienen altas cantidades de grasas, azúcar y sal; 2) consumo de comida rápida y aumento considerable en el consumo de bebidas con altos niveles de azúcar, de acuerdo con la OMS, México se ubica en el primer sitio a nivel mundial en el consumo de refresco (OMS, 2010); 3) disminución del tiempo para la preparación de alimentos con su respectivo balance en porciones; 4) exposición a publicidad sobre alimentos industrializados y productos de fácil preparación; 5) disminución de la actividad física; y 6) horas de sueño insuficientes, existe evidencia de que el sueño insuficiente, dormir menos de 7 horas recomendadas, se vincula a un mayor riesgo de obesidad, ya que el perfil metabólico se altera dando como resultado un incremento en el apetito, generado por la desregularización de hormonas como la leptina y grelina que regulan la sensación de saciedad y por consecuencia la ingesta de más calorías (Durán y col., 2016).

1.5. Bebidas funcionales como alternativa contra la obesidad

En México el 21% de la ingesta de energía total en adolescentes y adultos proviene del consumo de bebidas, particularmente de jugos, leche entera, bebidas azucaradas (refrescos) y alcohol (Barquera y col., 2008) (Figuras 6 y 7). Esta cantidad de calorías se adiciona a la energía proveniente de los alimentos de la dieta y contribuye al consumo excesivo de calorías vinculado con el sobrepeso, obesidad y diabetes.

El aumento de la ingesta de calorías provenientes de bebidas calóricas en la población mexicana mayor de dos años ha aumentado de 100 a 300 kcal al día a partir del año 2006, por lo que se propone que para satisfacer las necesidades diarias de líquidos se realicen mediante agua y bebidas con bajo contenido energético para la promoción de un buen perfil nutricional. Las infusiones se encuentran dentro de las bebidas recomendadas debido al aporte de agua, micronutrientes y fitoquímicos,

estos beneficios permiten que este producto se clasifique dentro de las bebidas funcionales (Rivera y col., 2008).

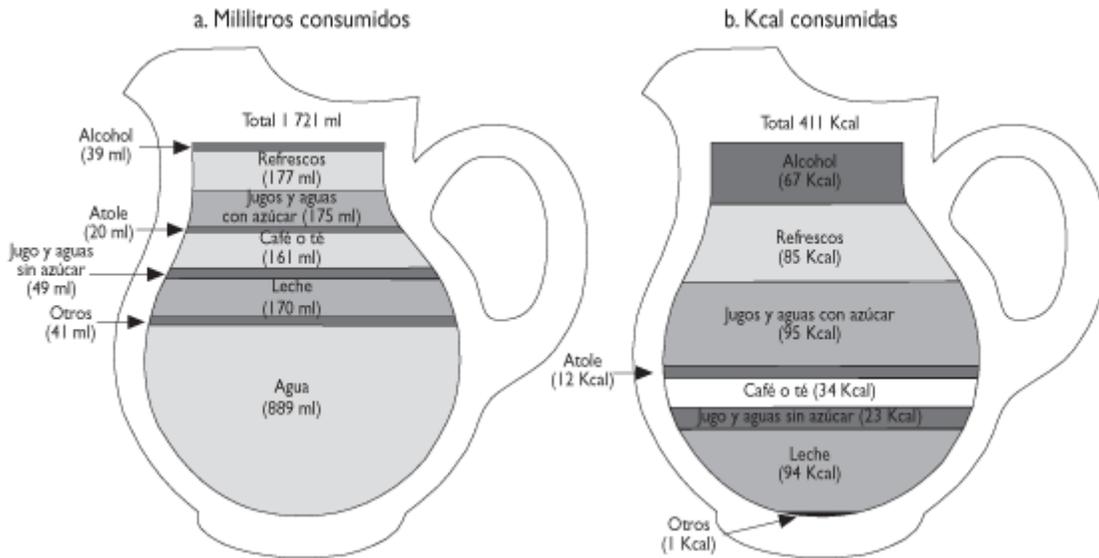


Figura 5. Patrón diario de consumo de bebidas en adulto mexicanos en el 2006 (Rivera y col., 2008).

Una infusión se define como una bebida obtenida a partir de las hojas secas, flores y/o frutos, a los cuales se les vierte agua a punto de hervor (Murillo, 2002). Estas bebidas están constituidas principalmente por polifenoles, los cuales son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer una amplia cantidad de grupos bencénicos sustituidos por grupos hidroxilos, los cuales son considerados importantes en la dieta ya que contienen efectos positivos en la salud (Apak y col., 2007).

México es uno de los países con una tradición importante en el consumo de infusiones, la cual ha incrementado considerablemente ya que se relaciona con beneficios para la salud. El té verde es de las infusiones más consumidos en México, durante el 2008 el té se posicionó en el tercer lugar de consumo de bebidas en México (Rivera y col., 2008).

De acuerdo a los resultados de la encuesta nacional de gastos de los hogares (ENGASTO 2013), la infusión de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) en presentación de bolsa para té es una de las más populares por su bajo costo y beneficios a la salud.

Cuadro 1. Infusiones más consumidas en México según la Encuesta Nacional de Gastos de los Hogares, 2013.

Infusiones más consumidas en México	
Nombre común	Nombre científico
Anís	<i>Pimpinella anisum</i>
Canela	<i>Cinnamomum verum</i>
Manzanilla	<i>Chamaemelum nobile</i>
Menta	<i>Mentha</i>
Hierbabuena	<i>Mentha piperita</i> y <i>Mentha spicata</i>
Jamaica	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
Té verde y negro	<i>Camellia sinensis</i>
Azahar	<i>Citrus aurantiifolia</i>
Limón	<i>Cymbopogo citratus</i>

1.6. Hierbabuena

El género *Mentha* es una planta nativa de Europa la cual pertenece a la familia de las Lamiaceae, consiste alrededor de 32 especies. La más conocida es la *Mentha piperita* (Figura 6A) debido a su alto valor comercial, principalmente por la extracción del mentol empleado para la elaboración de diversos productos como medicamentos, dulces, licores, entre otros (Días y col., 2003). La infusión de *Mentha spicata* (Figura

6B) ha sido empleada principalmente en tratamiento de problemas digestivos además de presentar actividad antioxidante y antimicrobiana.



Figura 6. Variedades de hierbabuena. A) *Mentha piperita* B) *Mentha spicata*.

La hierbabuena es consumida de forma muy cotidiana siendo la infusión su principal presentación, debido a su bajo costo, fácil acceso y beneficios que se le atribuyen como en el tratamiento de gripe, fiebre, náuseas y vómitos, además de presentar antioxidantes, esta última característica ha llevado al estudio de polifenoles de varias especies de *Mentha*, además del contenido de terpenoides y otros componentes (McKay y Blumberg, 2006).

En un estudio realizado por Barbalho y colaboradores (2011) en ratas Wistar inducidas con streptozocina a diabetes se demuestra la eficacia de *Mentha piperita* (administrada en forma de infusión) con la disminución de triglicéridos, glucosa y LDL, y un aumento de HDL en plasma por lo que se concluye que esta infusión mejora el perfil lipídico y glucémico, estos beneficios se atribuyen a compuestos químicos como los flavonoides de acuerdo al estudio reportado por Doyama y col., (2005). De acuerdo al estudio realizado por Lomelí de la Rosa (2011), en el cual se evalúa el efecto de infusiones entre ellas *Mentha spicata* en un modelo de obesidad se encuentra una disminución significativa de triglicéridos y colesterol séricos al igual que en el peso corporal.

Los componentes químicos de la hierbabuena varían según la madurez de la planta, la zona geográfica y las condiciones de su procesamiento (Xu y col., 2011). El

contenido total de polifenoles en las hojas de la hierbabuena es aproximadamente 19-23% (12% son flavonoides totales), los cuales incluyen 59-67% eriocitrina y ácido rosmarínico, 7-12% luteolina 7-O-rutinósido, 6-10% hesperidina. Alrededor del 75% del contenido de compuestos fenólicos presentes en las hojas de hierbabuena son extraídos en las infusiones (Areias y col., 2001; Zheng y Wang, 2001).

El ácido rosmarínico tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria, las cuales se relacionan con la inhibición de la lipoxigenasas y la ciclooxigenasas, enzimas relacionadas con procesos inflamatorios (Parnham y Kesselring, 1985). Se ha reportado que la hesperidina, y la eriocitrina protegen contra la inflamación y el estrés oxidativo causado por el consumo de la dieta alta en grasas y acumulación de grasa visceral, de acuerdo con los marcadores inflamatorios, peroxidación lipídica, la esteatosis y daños en el riñón, y el peso del bazo y el corazón (Ferreira, 2014).

1.7 Mecanismos de defensa

Las plantas pueden acumular una cantidad sorprendente de pequeños compuestos, a menudo llamados metabolitos secundarios, que son de gran interés por su posible uso como fármacos y aditivos alimentarios. Muchos metabolitos secundarios tienen importantes funciones ecológicas ya que disuaden a los herbívoros y protegen contra los patógenos microbianos. Por lo tanto, estos metabolitos tienen funciones importantes y específicas para la protección y nutrición de la planta bajo circunstancias de estrés. Una clase de metabolitos secundarios son las fitoanticipinas las cuales incluyen saponinas, una clase de glicoalcaloides triterpenoides con actividad antimicrobiana (Ferrari, 2010). Otros ejemplos son las fitoalexinas que incluyen flavonoides, taninos, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos. El papel de estas moléculas es inhibir a los patógenos o herbívoros potenciales que tratan de atacar a la planta. Estos compuestos son de gran interés para la salud humana ya que presentan actividad antioxidante (Sánchez y col., 2013).

Las estrategias más aplicadas para aumentar la producción de estos metabolitos secundarios es por medio de la aplicación de inductores químicos también conocidos como elicitores, los cuales estimulan a la planta por medio de señales que activan

los receptores extracelulares o intracelulares en la superficie de la membrana plasmática. Esta activación inicia una cascada de señales generando la biosíntesis de metabolitos secundarios (Vivanco y col., 2005).

1.8 Elicitores

La elicitación es uno de los métodos más efectivos en procesos a gran escala para la inducción sobre la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios, los cuales se activan como mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos o daños en plantas (Namdeo, 2007; Baldi y col., 2006). El término “elicitor o inductor químico” se utiliza para denominar los factores físicos o químicos responsables de las respuestas fisiológicas o morfológicas en las plantas. De acuerdo a su origen y estructura se clasifican en endógenos y exógenos (Radman y col., 2003). Los elicitores endógenos son sintetizados por la misma planta en respuesta al ataque de patógenos y los elicitores exógenos, se aplican de manera externa para inducir algún efecto (Edreva y col., 2008). Estos últimos pueden ser agentes abióticos, tales como iones metálicos o compuestos inorgánicos, o se pueden derivar de otros organismos, tales como moléculas derivadas de hongos, bacterias, virus o herbívoros, así como productos químicos derivados de plantas que se liberan en el sitio de ataque (Ferrari, 2010). Generalmente, su presencia en la planta desencadena mecanismos que implican la producción de ERO (especies de oxígeno reactivo), la expresión de enzimas antioxidantes y la síntesis de metabolitos secundarios de defensa, como los polifenoles (Edreva y col., 2008). Los elicitores son sistemas de bajo costo con un beneficio amplio en la obtención de metabolitos secundarios los cuales pueden ser empleados para la producción de compuestos o productos de interés en la salud humana (Wilken y col., 2005).

1.8.1 Ácido Salicílico

El ácido salicílico (AS) forma parte los metabolitos secundarios sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. Estos compuestos participan en muchas

actividades metabólicas en las plantas como la síntesis de lignina y algunos compuestos como las fitoalexinas (Sánchez y col. 2013). El ácido salicílico puede estar involucrado en la regulación de la absorción de varios elementos benéficos para la planta como Mn, Ca, Cu, Fe, P, y Zn (Wang y col., 2011).

Además, el AS endógeno y exógeno tienen un papel importante en el metabolismo antioxidante y tienen un control sobre las ERO celulares (Kang y col., 2014; Khan y col., 2003). La coordinación de la señalización independiente y dependiente de AS en conjunto con la señalización de ROS proporciona una respuesta de defensa en la planta. En conjunto a esto, la aplicación exógena de AS aumenta el contenido de importantes compuestos como los fenólicos, alcaloides y antocianinas (Khan y col., 2015).

Experimentos realizados previos a este trabajo en el Laboratorio de Bioquímica Molecular del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro han demostrado que los compuestos bioactivos de la hierbabuena son aumentados cuando la planta es sometida a estrés biótico y abiótico. En estos experimentos se demuestra que el estrés por déficit de humedad aumenta el 25% en el contenido de fenoles totales y flavonoides totales específicamente. Con respecto al uso de elicitores como el ácido salicílico (AS), su aplicación foliar a una concentración de 1 mM a plantas de *Mentha piperita* mejoró el perfil de compuestos fenólicos. La aplicación foliar de los elicitores incrementó la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en las infusiones de hierbabuena, siendo hesperidina y ácido rosmarínico los compuestos con aumento considerable en su concentración (Figuroa-Pérez y col., 2015). Las infusiones elaboradas con las hojas de la hierbabuena con tratamiento de AS presentaron una mayor actividad antioxidante siendo la concentración de 1 mM y 0.5 mM las que presentan efectos significativos en comparación al control (Figuroa-Pérez y col., 2014).

Se evaluó la actividad biológica de la hierbabuena (*Mentha piperita*) tratada con AS 2 mM y cultivada en invernadero, estas infusiones se administraron por un periodo

de cuatro semanas a ratas diabéticas previamente inducidas con estreptozotocina y alimentadas con una dieta alta en grasas, en este trabajo se concluye que el tratamiento disminuyó los niveles de glucosa en suero hasta en un 25% con un aumento significativo de insulina en suero hasta del 75% en comparación con el control diabético, estos parámetros se relacionaron con la protección en células β -pancreáticas. Todos los animales tratados con infusiones de hierbabuena presentaron un menor contenido de triglicéridos hepáticos y en suero, donde la infusión de hierbabuena elicitada con SA 2 mM mostró el efecto más alto (Figuroa-Pérez y col., 2015). Sin embargo no se había realizado estudios en los cuales se investigara cual es el mecanismo sobre el que estaban teniendo efecto las infusiones para promover una mejora en la esteatosis hepática, motivo por el cual se realizó este proyecto de investigación.

2. HIPÓTESIS

Las infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* debido a sus diferencias en compuestos bioactivos tendrán efectos diferenciales en la protección de la esteatosis hepática, la cual será mejorada al someter las plantas a elicitación con ácido salicílico incrementando la concentración de compuestos bioactivos que regulan el metabolismo de lípidos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las infusiones de hierbabuenas (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicítadas con ácido salicílico 2 mM sobre el control de la esteatosis hepática en un modelo animal de obesidad.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de infusiones de hierbabuena elicítada con ácido salicílico sobre el peso corporal, triglicéridos en suero y esteatosis hepática en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa.

Evaluar el mecanismo de acción asociado al efecto de infusiones de hierbabuena elicítada con ácido salicílico sobre la esteatosis hepática mediante inhibición de la absorción intestinal de triglicéridos, síntesis de *novo* de ácidos grasos en hígado y β -oxidación de ácidos grasos en hígado.

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

4.1.1 Material vegetal

Se usaron 12 plantas de *Mentha piperita* (Mp) y 12 plantas de *Mentha spicata* (Ms), las cuales fueron adquiridas en el vivero Floraplant S.A. de C.V, con un tamaño inicial de 10 cm aproximadamente. Las plantas se trasplantaron en bolsas bicapa negra/blanca de 10L (30x40cm) y se aplicó un riego automatizado de 2 minutos por cada 10 min durante el día (12 h), el fertilizante se aplicó en el riego a todas las plantas el cual tuvo la siguiente composición para 5000 L: nitrato de calcio (3.265 kg), sulfato de magnesio (640 g), nitrato de potasio (1.5 kg), fosfato de potasio (1.23 g), sulfato de magnesio (640 g), ácido sulfúrico (223 mL), ácido nítrico (250 mL), nitrato de magnesio (1.06 Kg), quelato de Fe (76 g), quelato de Cu (2 g), quelato de Zn (11 g), borato de sodio (10 g) y molibdato de sodio (1 g).

Las plantas fueron identificadas en el Herbario “Dr. Rzedowski” del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Juriquilla, por el M. en C.J. Alejandro Cabrera.

4.1.2 Material biológico

Se utilizaron 48 ratas macho Wistar de 200-230 g, las cuales fueron adquiridas en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México, campus Querétaro. Los animales se dividieron en 6 grupos (8 ratas por grupo), las cuales fueron aclimatadas por 7 días bajo condiciones ambientales estándar (40-60% humedad relativa, 24 ± 2 °C de temperatura y un ciclo de 12 horas de luz-obscuridad).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Inducción de las hierbabuenas con ácido salicílico

La inducción de las plantas de hierbabuena se realizó con una dosis única en el día 45 después del trasplante. Las plantas se trataron al azar con solución de ácido salicílico 2 mM en agua destilada por aspersion. En el día 59 se realizó la recolecta

total de material vegetal de cada una de las hierbabuenas y se secó a 45°C durante 24 h y posteriormente se molió (de forma individual) y se colocó en bolsas con cierre hermético. Las infusiones que se prepararon al 1% con agua potable, la cual fue suministrada durante la noche, esto debido a que las ratas tienen una mayor actividad durante este horario.

4.2.2 Evaluación del efecto de la ingesta de infusiones sobre la esteatosis hepática no alcohólica.

Las ratas se clasificaron en 2 grupos: i) grupo control sano, fue alimentado con una dieta estándar y ii) grupo obeso, el cual fue alimentado con una dieta alta en manteca (20%) y fructosa (18%) (Cuadro 2) durante 10 semanas. Los animales correspondientes al grupo obeso fueron subdivididos en cinco grupos: i) grupo control obeso, al cual se le administrará agua *ad libitum*; ii) grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Mp control; iii) grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Mp AS 2 mM; iv) grupo obeso con tratamiento de hierbabuena Ms control; v) grupo obeso con tratamiento Ms AS 2 mM (Cuadro 3).

Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas estándar y alta en grasa y fructosa

Nutrientes	Dieta estándar	Dieta alta en grasas y fructosa
Proteínas	24%	13%
Carbohidratos	45%	43%
Fructosa	0.3%	18%
Manteca	5%	20%
Saturados	1%	6%

El experimento se llevó a cabo durante seis semanas más. En las cuales se realizaron mediciones semanales del peso corporal. Al finalizar el experimento los animales fueron sacrificados por medio de decapitación, previamente los animales fueron sometidos a 12 hrs de ayuno en el cual se realizó recolecta de heces. En el sacrificio se realizó la colecta de hígado y sangre. El hígado fue pesado y congelado

en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C. Una fracción de los tejidos fue almacenada en una solución amortiguadora de formalina al 10% (pH 7.4) para los análisis histológicos.

4.2.3 Cuantificación de triglicéridos en suero

Se cuantificó los triglicéridos en suero por medio de un kit colorimétricos/enzimáticos de la marca Spinreact y los resultados se expresaron como mg/dL de suero, de acuerdo con las instrucciones de la ficha técnica del fabricante.

4.2.4 Evaluación del efecto de las infusiones de hierbabuena tratada con ácido salicílico sobre la esteatosis hepática

4.2.4.1 Análisis histológico del tejido hepático

Los tejidos fueron embebidos en parafina, cortados en secciones de 5 µm, y teñidos con la solución de Harris de hematoxilina y eosina (H&E). Las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo microscopio a 100X, 300X y 600X analizando 5 imágenes por animal.

Cuadro 3. Grupos de los estudio *In vivo* para la evaluación de las infusiones de hierbabuena tratadas con ácido salicílico

Grupo	Dieta	Tratamiento
Control sano	Estándar	Agua
Control obeso	Alta en grasa (20%) y fructosa (18%)	Agua
<i>Mentha piperita</i> control	Alta en grasa (20%) y fructosa (18%)	Infusión al 1%
<i>Mentha piperita</i> AS 2 mM	Alta en grasa (20%) y fructosa (18%)	Infusión al 1%
<i>Mentha spicata</i> control	Alta en grasa (20%) y fructosa (18%)	Infusión al 1%
<i>Mentha spicata</i> AS 2 mM	Alta en grasa (20%) y fructosa (18%)	Infusión al 1%

4.2.5 Triglicéridos en hígado

Los hígados se pesaron (100-300) mg, se agregó 350 μ L de hidróxido de potasio en etanol (2 partes de etanol por 1 parte de KOH al 30%) y se incubaron a 55 °C por una noche. Una vez digerido el tejido por completo las muestras se agitaron en vortex por 5 min y se les agregó 650 μ L de solución de agua:etanol (1:1), se volvió agitar la muestra en vortex por 1 min y se transfirieron 200 μ L en un tubo eppendorf nuevo agregando 215 μ L de cloruro de Magnesio (1 M), las muestras se mantuvieron en hielo por 10 min. Se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se utilizó un kit colorimétrico-enzimático de marca Spin-react, de acuerdo a las especificaciones de la ficha técnica del fabricante. El resultado se expresó como mg de triglicérido por g de tejido.

4.2.6 Evaluación del mecanismo de acción de la esteatosis hepática

4.2.6.1 Cuantificación de triglicéridos en heces fecales

La cuantificación de triglicéridos en heces fecales se realizó por el método de Folch y colaboradores (1957). Las muestras de heces de los 6 grupos de ratas se llevaron a sequedad durante 12 hrs a temperatura constante (55 °C). Una vez secas las muestras se molieron en un mortero y se pesó 50 mg de cada muestra (las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL), se les agregó 100 μ L de cloruro de sodio (0.9%) y 400 μ L de cloroformo:metanol (2:1), se agitaron en un vortex por 5 min y se congelaron a -20 °C por 12 hrs. Las muestras se colocaron en el sonicador a alta potencia y cada 15 min se retiraron los tubos para enfriar el agua del sonicador, este paso se repitió hasta completar una hora; posteriormente se centrifugaron las muestras a 70000 x g por 10 min y se retiró el sobrenadante con una micropipeta y este fue llevado a sequedad (se observó una mancha color café en el fondo de cada tubo). Finalmente se resuspendió la muestra con 50 μ L agua destilada. Se utilizó un kit colorimétrico-enzimático de marca Spin-react, de acuerdo con las especificaciones de la ficha técnica del fabricante.

4.2.6.2 Evaluación de lipogénesis y beta oxidación hepática

4.2.6.2.1 Extracción, purificación de ARN y síntesis de ADN a partir de tejido de hígado

Se lisaron 50 mg de tejido hepático con 1 mL de reactivo Trizol (Qiagen) y se aisló el ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se midió con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 instrument (Thermo Scientific, Wilmington, D.C., E.UU.) a 260 nm y la pureza fue evaluada utilizando relaciones de 260/280 u 260/230, mientras que la integridad del ARN se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

La síntesis de ADNc se realizó con 1 µg de ARN total, 6 µL de tampón de reacción M-MLV 5X (Invitrogen) y 0.75 µL de DNAsa, posteriormente se incubaron las muestras 15 minutos a 25 °C, transcurrido el tiempo se incubaron las muestras 5 minutos a 70 °C y posteriormente se adicionó 1 µL de oligo dT 5 µM (15 bases), 1 µL de mezcla dNTP 10 mM (Invitrogen), 2 µL de M-MLV 5X (Invitrogen), 3 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 1 µL de inhibidor de RNasa (Invitrogen), 1 µL (200 U) de RTV M-MLV (Invitrogen) y agua libre de RNasa suficiente hasta un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó a 42 °C durante 50 min, la reacción se detuvo incubando a 70 °C durante 15 min.

4.2.6.2.2. PCR en tiempo real

La expresión de ARN se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems, California, EE. UU.), cada muestra se analizó por duplicado, y la abundancia relativa de ARNm se calculó mediante la normalización a 18s y β-actina de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La normalización se realiza mediante la preparación de una mezcla maestra: 1 µL de ADNc, 2 µL de los oligonucleótidos correspondientes (1 µL oligonucleótido directo y 1 µL oligonucleótido reverso) a una concentración de 10 µM, 10 µL de Sybr Green y agua libre de RNasa suficiente para un volumen final de 20 µL. El programa se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C/10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C /15 s para la desnaturalización, 60 °C/10 s para la alineación del cebador y 72 °C/30 s para

el alargamiento. Las curvas de fusión se registraron de la siguiente manera: 95 °C /1 s, 65 °C /1 min y 95 °C /15 s.

La expresión de los genes de interés (cuadro 4) se realizaron con la preparación de la mezcla maestra: 1 µL de ADNc, 2 µL de los oligonucleótidos correspondientes (1 µL oligonucleótido directo y 1 µL oligonucleótido reverso) a una concentración de 10 µM, 10 µL de Sybr Green y agua libre de ARNasa suficiente para un volumen final de 20 µL. El programa para los genes Acadm, CPT1a y Acaca se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C/10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C /15 s para la desnaturalización, 60 °C/10 s para la alineación del cebador y 72 °C/30 s para el alargamiento. Las curvas de fusión se registraron de la siguiente manera: 95 °C /1 s, 57 °C /1 min y 95 °C /15 s, para el gen Srebp-1c las curvas de fusión se registraron de la siguiente manera: 95 °C /1 s, 55 °C /1 min y 95 °C /15 s.

Cuadro 4. Oligonucleótidos usados para el análisis de PCR en tiempo real en muestras de tejido hepático.

Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
Acadm	TACTGCGTGACAGAACCC	TTTTCCGATGTGTATTCCC
Cpt1a	CCATCCACGCCATACTGCT	AGCCAGACCTTGAAGTACCG
Acaca	GCTGGGCTTAAACCCCTCAT	CTTGGGGTGATGCTCCCCATT
Srebp-1c	GTAAACGTGGGTCTCCTCCT	GCCTGTGTCTCCTGTCTCAC

4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un diseño experimental multifactorial con una población de 24 plantas de cada variedad, con una n=6 plantas por tratamiento. El experimento in vivo fue un 2² con una población total de 48 ratas, una n=4 jaulas con dos individuos por tratamiento. Los tratamientos fueron infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* tratadas con AS 2 mM y sin tratar (Mp control, Mp AS 2 mM, Ms control y Ms AS 2 mM). Las variables respuesta fueron: el grado de esteatosis hepática, concentración

de triglicéridos en hígado y heces y expresión de genes en síntesis de ácidos grasos y β -oxidación. Los resultados se reportaron como la media \pm error estándar de la media (EE). El análisis estadístico se determinó mediante la comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer (programa JMP 10.0), con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Efecto sobre el peso corporal de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratadas con ácido salicílico 2 Mm

La pérdida de peso corporal de los animales en estudio se puede generar por medio de la reducción del consumo energético o el incremento del gasto energético. Algunos autores sugieren que los tratamientos se consideran benéficos cuando se logra una disminución del 5-10% en el peso corporal, ya que esto se asocia con una mejora considerable en los factores de riesgo que provoca esta enfermedad. Los tratamientos convencionales (medicamentos) son riesgosos o poco efectivos ya que sus efectos adversos suelen ser numerosos y peligrosos, como el caso del orlistat cuyo efecto secundario es pancreatitis aguda (Cruz y col., 2011).

En la Figura 7 se presentan los resultados del peso corporal de las ratas en el inicio (Semana 0) y al finalizar el tratamiento (Semana 16). Se observa que el control obeso ganó más peso corporal que el control sano (96.25 g). En el caso de los grupos tratados con las infusiones de hierbabuena no se presentan diferencias estadísticas significativas en la disminución del peso corporal, esto coincide con resultados reportados por Lomelí de la Rosa en 2011, en donde se administraron infusiones comerciales de *Mentha spicata ad libitum* como método preventivo de obesidad desde la semana 1 a la 12, durante el experimento no se observa una diferencia en la disminución de peso corporal con respecto al grupo obeso. En otro estudio realizado por Hernández Mendoza (2012), se reportó que la infusión de *Mentha piperita ad libitum* como método preventivo durante 12 semanas no muestra impacto en la disminución del peso corporal.

Badal y colaboradores en 2011, reportaron el efecto del extracto acuoso de hojas de *Mentha piperita* (en dosis de 100 mg/kg y 250 mg/kg) sobre el peso corporal en ratas hembra Sprague Dawley, el experimento tuvo una duración de tres semanas como tratamiento preventivo, los resultados mostraron que la dosis de menor concentración no tuvo un efecto sobre la disminución del peso corporal y la dosis más alta si demostró una baja en el peso corporal, estos datos confirman que el aumento de la concentración de las infusiones disminuyen el peso corporal de las ratas sometidas a una dieta alta en grasas, sin embargo Akdogan y colaboradores en el año 2003 demostraron que la infusión de *Mentha spicata* a una concentración mayor al 1% presenta un efecto nefrotóxico y en el 2004 este mismo autor reporta que con una concentración mayor al 1% las infusiones de *Mentha piperita* y *Mentha spicata* presentan efecto peroxidativo de lípidos y daño hepático.

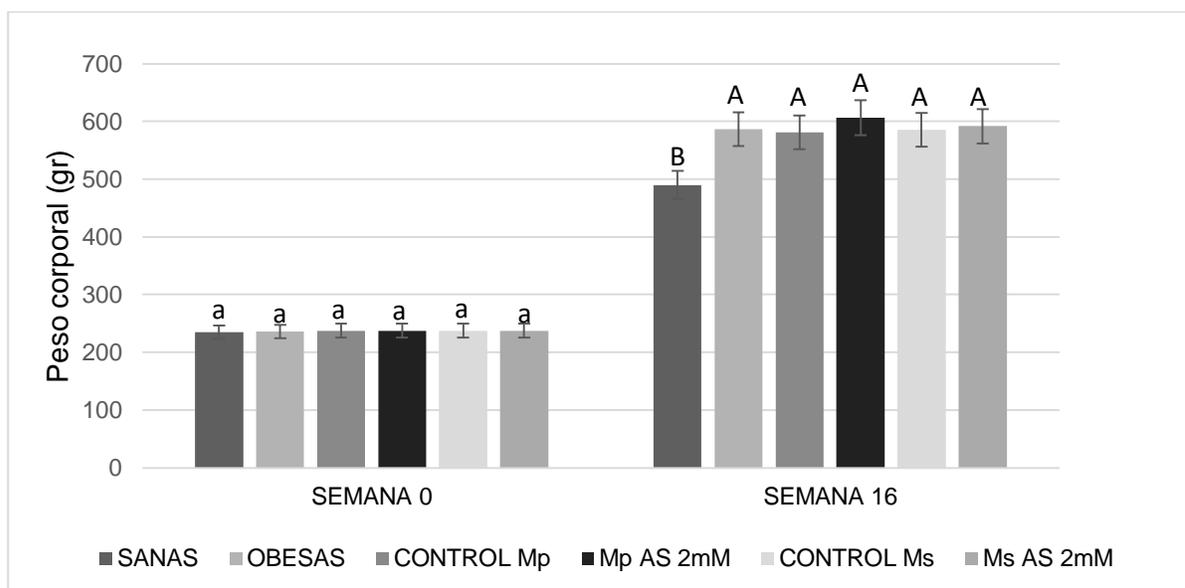


Figura 7. Efecto del consumo de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicitada con ácido salicílico 2 mM sobre la ganancia de peso de ratas macho Wistar obesas. Resultados expresados como la media \pm EE (n=6). Letras diferentes indican diferencia entre tratamiento ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

5.2 Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicitada con ácido salicílico 2 mM sobre la concentración de triglicéridos séricos

Los resultados obtenidos en la cuantificación de triglicéridos séricos de ratas con dieta alta en grasa y fructosa y tratadas con infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) se observan en el Cuadro 5. El control obeso presentó niveles de triglicéridos séricos en ayuno del 38.21% más que el control sano. En el caso de los grupos de ratas tratadas con las infusiones, todos los tratamientos mostraron valores similares al grupo sano con una disminución desde de 21 al 38%, y solamente el control Mp también fue similar al grupo obeso (11.62%), lo que indica que este fue el grupo que presentó menor efecto sobre los niveles de estos lípidos. En los grupos donde se observa una disminución considerable de la concentración de triglicéridos séricos se estima que hay una regulación en el metabolismo de lípidos por medio de la síntesis de novo o la disminución en la absorción de triglicéridos.

Cuadro 5. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicitadas con ácido salicílico 2 mM sobre el contenido de triglicéridos séricos en ratas macho Wistar obesas.

Grupo	Triglicéridos (mg/dL)
Sanas	57.14± 2.24 ^c
Obesas	92.48 ± 7.12 ^a
Mp Control	81.73±7.59 ^{abc}
Mp AS 2 mM	73.36± 7.75 ^{bc}
Ms Control	57.37±7.47 ^c
Ms AS 2 mM	68.97±7.21 ^{bc}

Los resultados son expresados como la media ± EE (n=6). mg dL⁻¹. Diferentes letras por renglón representan diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

El efecto de disminución de triglicéridos séricos de la hierbabuena se atribuye a los compuestos fenólicos como la hesperidina, la cual tiene su efecto inhibiendo la lipasa

pancreática como lo menciona Kawaguchi y col., en 1997. Por otro lado de acuerdo a la caracterización de las dos variedades de hierbabuena (*Mentha spicata* y *Mentha piperita*) realizado por Rangel García (2018), los resultados obtenidos en este estudio indica que *Mentha piperita* control y elicitado presentan un mayor contenido de este metabolito, sin embargo, estos son los grupos que presentaron menor efecto sobre la disminución de triglicéridos, por lo tanto, el efecto puede estar relacionado a otros compuestos o a una mezcla de fitoquímicos.

5.3 Cuantificación de triglicéridos en heces

La absorción de lípidos a nivel intestinal es de un 95% , los cuales una vez absorbidos son transportados como triglicéridos en quilomicrones principalmente a tejido muscular y adiposo, la disminución de triglicéridos séricos está relacionado con la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática, este efecto es reportado para los compuestos bioactivos encontrados en las infusiones de hierbabuena generando una disminución en la absorción y un incremento en la excreción de triglicéridos en las heces (Hsu y col., 2006).

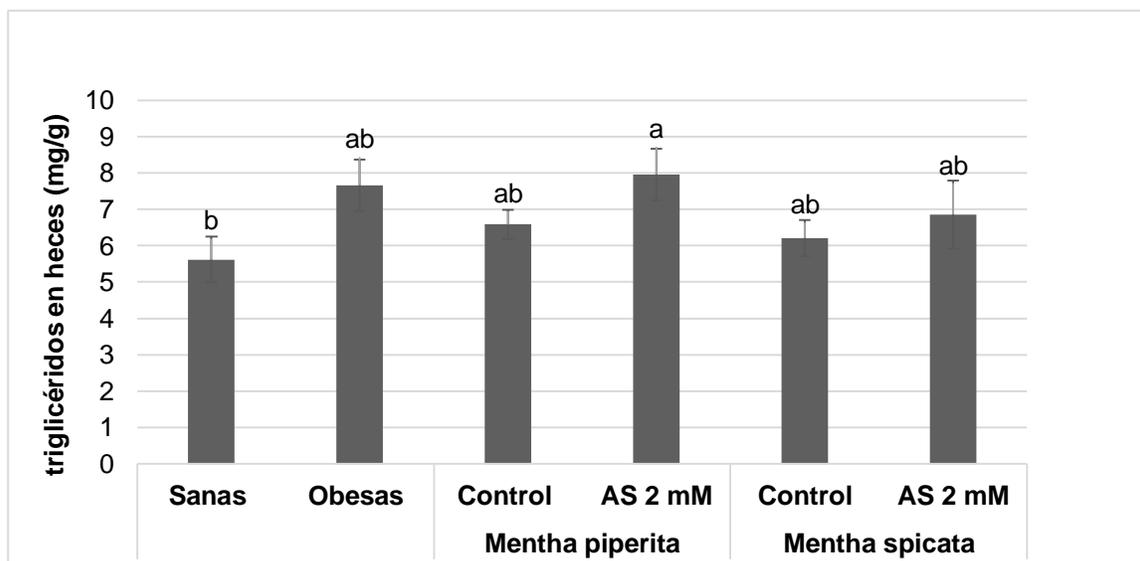


Figura 8. Efecto del consumo de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicitada con ácido salicílico 2 mM sobre la cuantificación de triglicéridos en heces de ratas macho Wistar obesas. Resultados expresados como la media \pm EE (n=6). Letras diferentes indican diferencia entre tratamiento ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

La evaluación de triglicéridos en heces nos permite identificar los mecanismos sobre los cuales los compuestos bioactivos de las infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) podrían tener un efecto positivo.

En la Figura 8 se observan los resultados de la cuantificación de triglicéridos en heces de ratas macho Wistar obesas en los cuales no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados con la infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) y el grupo obeso, por lo que se descarta que los tratamientos tengan un efecto sobre la inhibición en la absorción de lípidos a nivel intestinal.

5.4 Concentración de triglicéridos y el grado de esteatosis en hígado

Una de las complicaciones generada por la obesidad es la esteatosis hepática no alcohólica, la cual se desarrolla cuando hay una acumulación excesiva de triglicéridos en más del 5% en los hepatocitos (Castro y Silvia, 2015), este exceso de lípidos es debido a la pérdida del balance entre la captación, síntesis, excreción y oxidación de los ácidos grasos libres (McCullough, 2004). El contenido de triglicéridos en hígado se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de las infusiones de hierbabuena sobre el almacenamiento de éstos, los cuales pueden provenir del tejido adiposo o la síntesis de *novo*.

Los resultados del contenido de triglicéridos en tejido hepático de ratas con obesidad inducida y tratadas con infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) son presentados en la Figura 9, en la cual se observa que el tratamiento con una disminución significativa de triglicéridos en hígado es el grupo con *Mentha spicata* AS 2 mM con 59% respecto al grupo obeso, este efecto de protección al tejido hepático se confirma en la Figura 10-f, en donde se observa que el grado de esteatosis es 1 en comparación con el grupo de ratas obesas (Figura 10-b) las cuales presentan un grado 4 de esteatosis, es decir, una acumulación mayor al 66% de triglicéridos en hepatocitos. El tratamiento de *Mentha spicata* control también presenta una disminución significativa del 53.50% de triglicéridos en hígado respecto al grupo obeso y un grado de esteatosis hepática 2. El grupo tratado con *Mentha*

piperita control presenta una disminución de triglicéridos en hígado del 27.02% y un grado de esteatosis hepática 3, como se observa en la figura 10-c la cantidad de vacuolas es similar al grupo obeso (10-b), por otro lado el grupo tratado con *Mentha piperita* AS 2 mM presenta una disminución de triglicéridos hepáticos del 38.70% con un grado de esteatosis hepática 2, presentando una protección al hígado y el mismo grado de esteatosis que el grupo tratado con *Mentha spicata* control, como se observa en la figura 10-d la disminución de vacuolas es similar a 10-e.

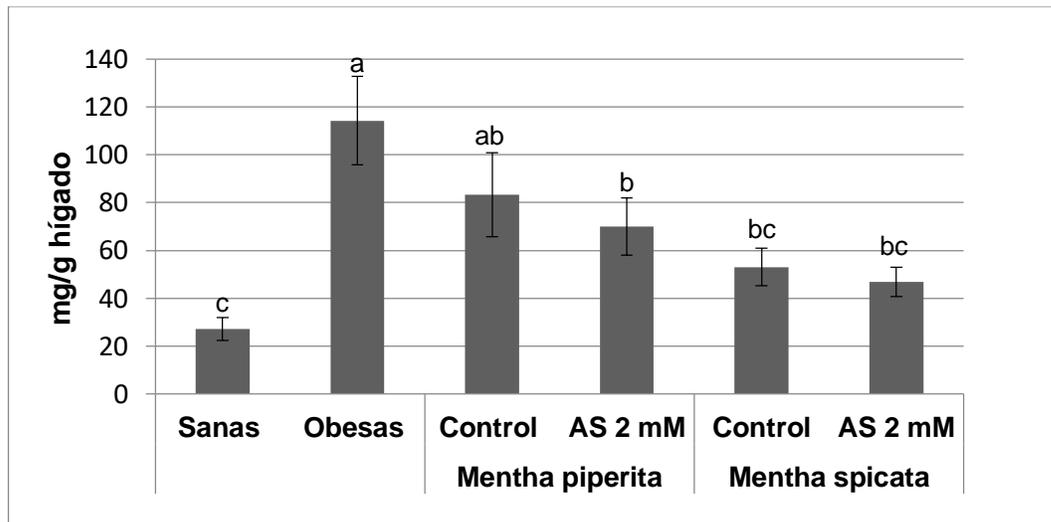


Figura 9. Efecto del consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con ácido salicílico (AS) 2 mM sobre el contenido de triglicéridos en hígado de ratas macho Wistar obesas. Los resultados son expresados como la media \pm EE (n=6) ($\alpha=0.05$, prueba de Tukey).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de triglicéridos en suero y heces se descarta que el tratamiento este asociado a la menor absorción de grasas a nivel intestinal, por otro lado los tratamientos presentan una disminución significativa en los triglicéridos en hígado y una mejora en la esteatosis hepática no alcohólica, por lo que los posibles mecanismos donde las infusiones estén llevando acabo su efecto son la lipogénesis de *novo* en el hígado o bien que el exceso de triglicéridos se estén metabolizando por medio de la vía de la β -oxidación.

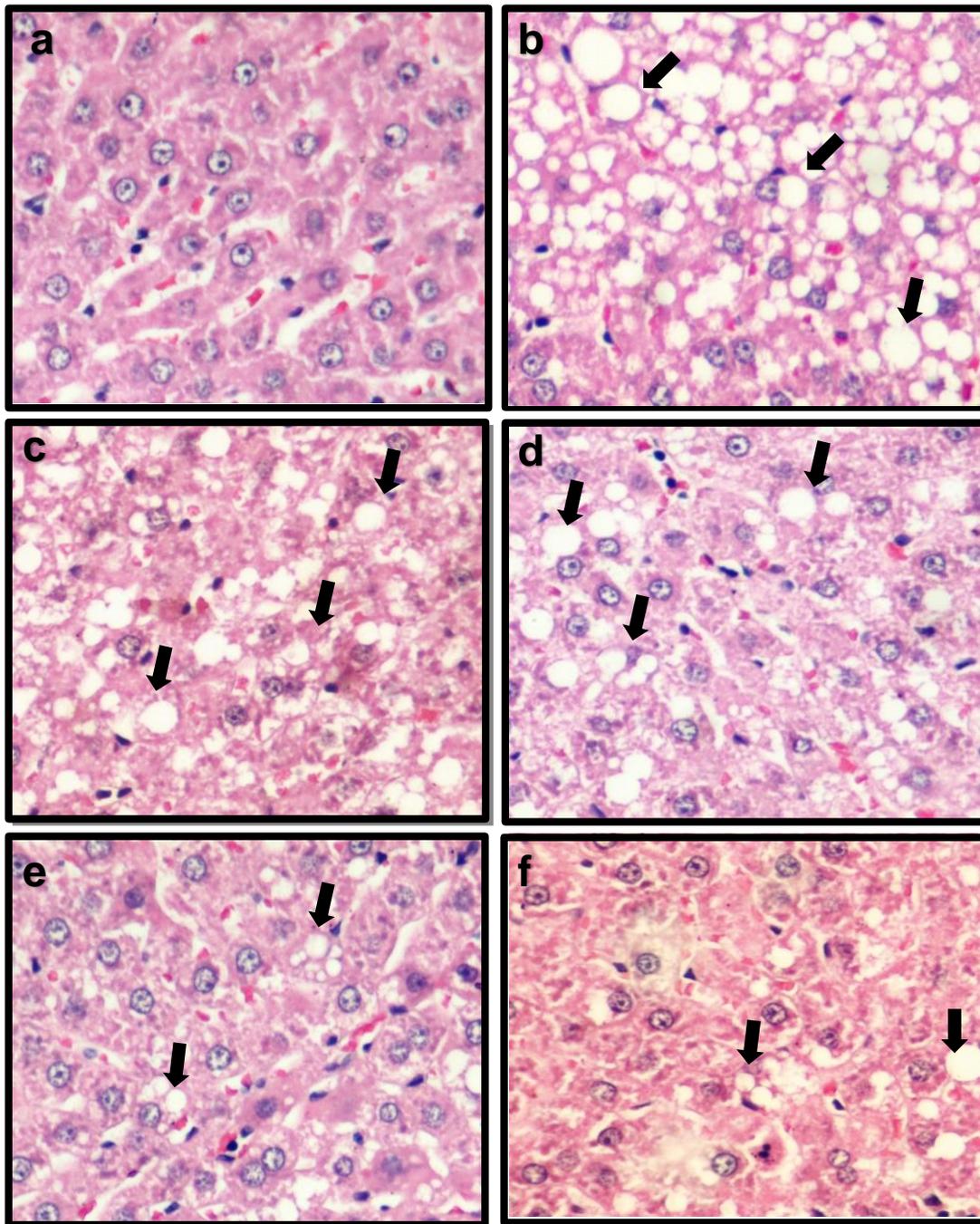


Figura 10. Identificación de esteatosis hepática. Microfotografías de tejido hepático teñidas con H&E con amplificación 300X: a) Sanas, b) Obesas, c) *Mentha piperita* control, d) *Mentha piperita* con ácido salicílico 2 mM, e) *Mentha spicata* control, f) *Mentha spicata* con ácido salicílico 2 mM.

5.5 Expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en tejidos de hígado de ratas obesas inducidas con una dieta alta en grasa saturada y fructosa.

Con la finalidad de demostrar si el efecto de las infusiones está relacionado con la modulación del metabolismo de los lípidos se realizó la evaluación de la expresión de genes implicados en la síntesis y β -oxidación de ácidos grasos en el hígado, esta evaluación se realizó solo con los tratamientos control de cada variedad de hierbabuena, debido a que no se observó un cambio significativo en los parámetros obtenidos entre las plantas elicidadas y sus respectivos controles.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que todos los grupos de ratas obesas con tratamiento presentaron una disminución en la expresión de los genes *Srebp-1c* el cual es un importante promotor de enzimas lipogénicas, activado por insulina (Figura 11-B) y *Acaca* (Figura 11-A), considerada la primer enzima limitante de la lipogénesis de *novo*, ya que sintetiza malonil-CoA el cual inhibe con facilidad la oxidación de ácidos grasos. La disminución de estos genes se observó principalmente en el grupo tratado con la infusión de *Mentha spicata* (control) en un 36.24% para el gen *Srebp-1c* y 37.94% para *Acaca* con respecto al grupo obeso, lo que puede generar una disminución en la síntesis y producción del malonil-CoA, sugiriendo una disminución en la síntesis de ácidos grasos y en consecuencia su almacenamiento en los hepatocitos, este resultado se relaciona directamente con lo encontrado en los resultados de cuantificación de triglicéridos en hígado en el cual disminuyó en un 53.50% (respecto al grupo obeso) y con un grado de esteatosis 2 (Figura 10-e).

Por otro lado, el grupo tratado con *Mentha piperita* presentó solo una disminución del 16.87% para el gen *Srebp-1c* y 17.16% para *Acaca* respecto al grupo obeso, estos resultados y los anteriores de cuantificación de triglicéridos en hígado demuestra que el tratamiento de *Mentha piperita* control no tiene un efecto significativo en la disminución de triglicéridos y su protección al hígado al presentar una esteatosis grado 3.

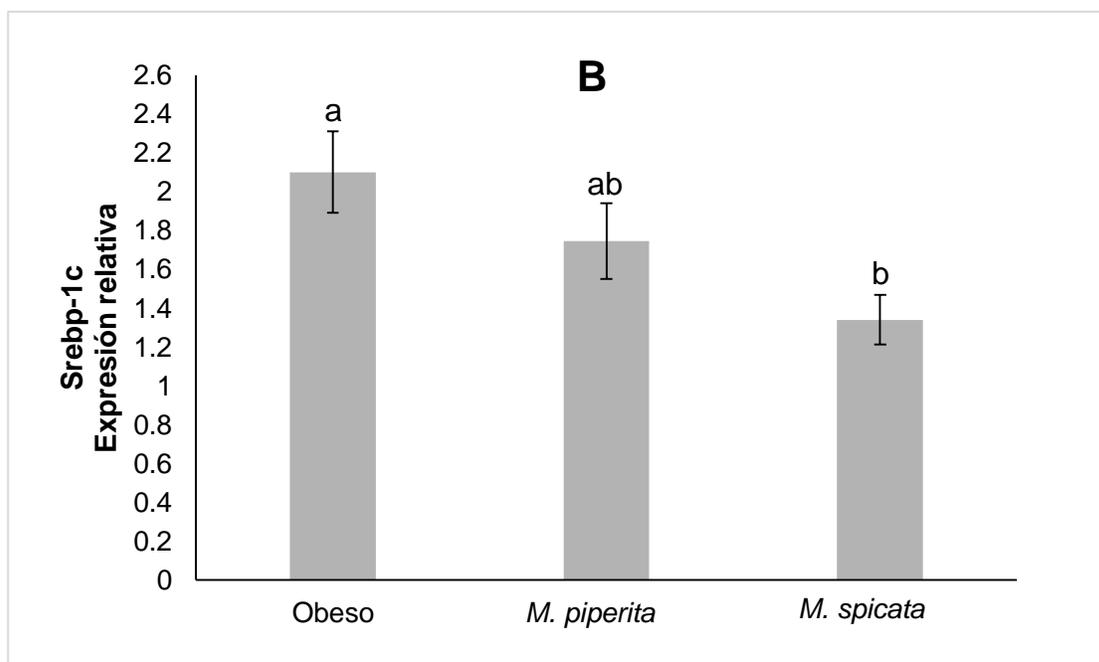
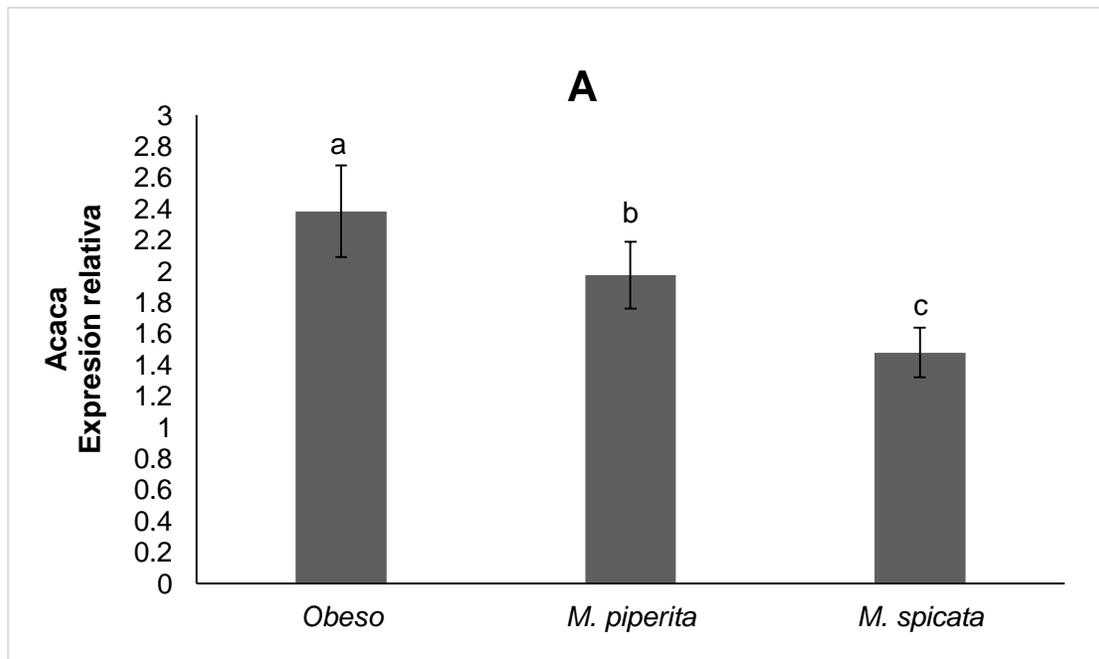


Figura 11. Cuantificación de mRNA de Acaca (A) y Srebp-1c (B) en hígado de ratas con obesidad inducida y tratadas con infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicidadas con ácido salicílico 2 mM. Se empleó la media entre 18S y β -actina como genes de referencia. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha= 0.05$ para prueba de Tukey).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la expresión de genes relacionados con la vía de la β -oxidación (Figura 12), en los tratamientos se observa que el grupo tratado con *Mentha spicata* no tiene impacto en la promoción de la β -oxidación ya que no se observa un aumento en la expresión de ninguno de los dos genes Cpt1a (carnitina palmitoil transferasa 1) y Acadam (acil-CoA deshidrogenasa de cadena media) respecto al grupo obeso. Para *Mentha piperita* se observó un efecto no esperado, ya que la expresión de este transcrito es menor que el grupo obeso.

Durante la β -oxidación se emplea la carnitina como primer paso para la oxidación de AG, ya que los ácidos grasos se unen a la carnitina mediante la enzima CPT-1 que es codificada por el gen Cpt1a. Por otro lado, el genes Acadm, codifica para la enzima MCAD, encargada de la oxidación de ácidos grasos de cadena media, la reducción o eficacia en la actividad de esta enzima provoca que estos AG de cadena media se metabolicen de forma parcial, acumulándose en tejidos como el hígado. En base a los resultados obtenidos, ninguna de las infusiones incrementó la beta oxidación.

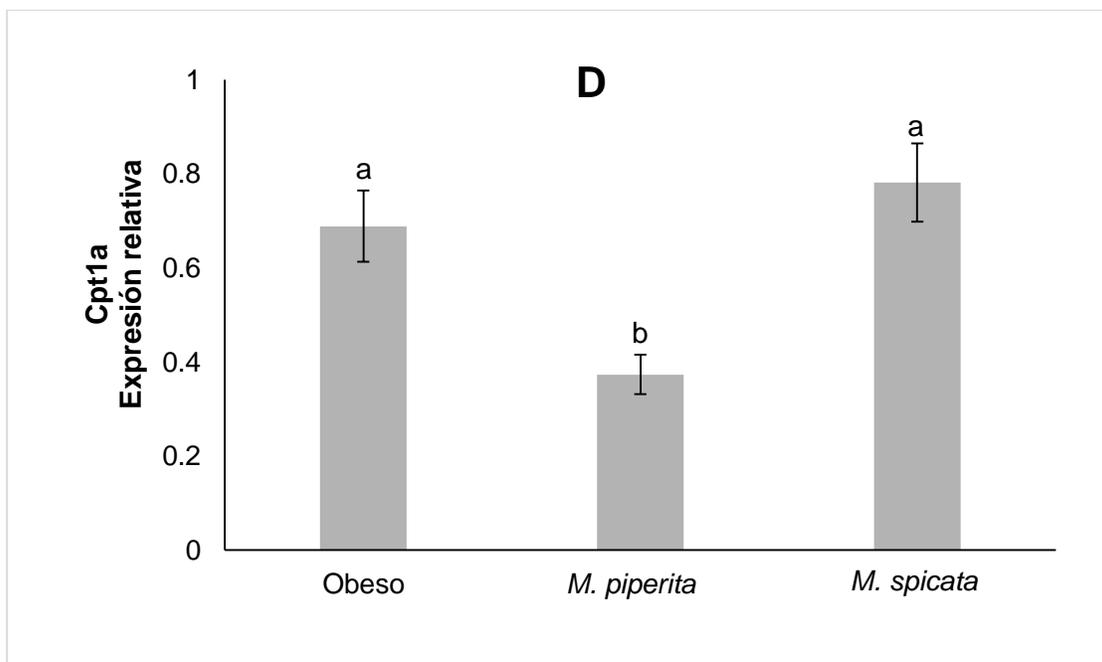
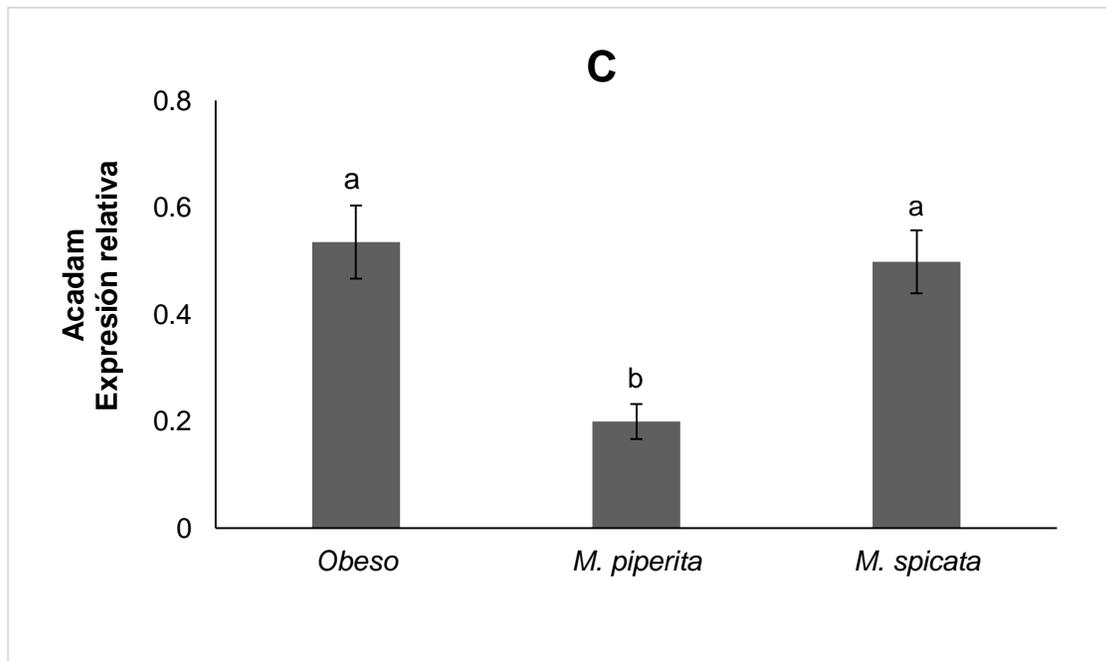


Figura 12. Cuantificación de mRNA de Acadm (C) y Cpt1a (D) en hígado de ratas con obesidad inducida y tratadas con infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) elicidadas con ácido salicílico 2 mM. Se empleó la media geométrica entre 18S y β -actina como genes de referencia. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha= 0.05$ para prueba de Tukey).

6. CONCLUSIONES

1. Las infusiones disminuyeron los niveles de triglicéridos en suero y este efecto no está relacionado con una mayor excreción de triglicéridos en heces.
2. El consumo de infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) al 1% no presentan un efecto sobre la disminución del peso corporal en las ratas obesas.
3. *Mentha piperita* y *Mentha spicata* mejoraron la esteatosis hepática, siendo el tratamiento de *Mentha spicata* el que mostró los mejores beneficios por medio de una disminución en la acumulación de triglicéridos en hígado, mediante la regulación de la expresión de genes como Srebp-1c y Acaca implicados en la lipogénesis de *novo*.
4. La infusión de *Mentha spicata* puede ser una alternativa viable para disminuir la esteatosis hepática no alcohólica.

7. REFERENCIAS

- Adiels M.**, Taskinen M R, Packard C, Caslake M J, Soro-Paavonen, A Westerbacka, J Boren. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* **2006**; 49: 755-765
- Akdogan M**, KWIWnc I, Oncu M, Karaoz E, Delibas N. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. *Human & experimental toxicology* **2003**; 22: 213-219
- Akdogan M**, Ozguner M, Aydin G, Gokalp O. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiatae and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. *Human & experimental toxicology* **2004**; 23: 21-28
- Apak R**, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik S, Bektaşoğlu B, Ozyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* **2007**; 12: 1496-1547
- Areias F M**, Valentao P, Andrade P B, Ferreres F, Seabra R M. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chem* **2001**; 73: 307–311
- Arora J**, Goyal S, Ramawat K G. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **2010**; 46:430-436
- Badal R M**, Badal D, Badal P, Khare A, Shrivastava J, Kumar V. Pharmacological action of *Mentha piperita* on lipid profile in fructose-fed rats. *Iranian journal of pharmaceutical* **2011**; 10: 843
- Baldi A**, Bisaria V S, Srivastava A K. Biotechnological Approaches for the Production of some Promising Plant-Based Chemotherapeutics. *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications* **2006**; 7:117-156
- Barbalho S M**, Spada A P M, Oliveira E P D, Paiva-Filho M E, Martuchi K A, Leite N C, Oshiiwa M. *Mentha piperita* effects on wistar rats plasma lipids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2009**; 52:1137-1143
- Barquera S**, Hernandez-Barrera L, Tolentino M L, Espinosa J, Ng S W, Rivera J A, Popkin B M. Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *The Journal of nutrition* **2008**; 138: 2454-2461

Bonnefont J P, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitina palmitoiltransferasas 1 y 2: aspectos bioquímicos, moleculares y médicos. *Mol Aspects Med* **2004**; 25: 495–520

Castro I, Silva G. Hígado graso no alcohólico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, **2015**; 26: 600-612

Cecchini M, Sassi F, Lauer J A, Lee Y Y, Guajardo-Barron V, Chisholm D. Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness. *The Lancet* **2010**; 376:1775-1784

Choi S H, Ginsberg H N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2011**; 22: 353-363

Choi S S, Diehl A M. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Current opinion in lipidology* **2008**; 19: 295-300

Cruz Copa C M, Delgadillo Céspedes M, Delgadillo López J P, Torres Ortiz G. Pancreatitis Aguda como consecuencia del uso de Orlistat. *Revista Científica Ciencia Médica* **2011**; 14: 35-38

Doerge H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* **2006**; 21:259–268

Doyama J T, Rodrigues H G, Novelli E L B, Cereda E, Vilegas W. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. *J. Ethnopharmacol* **2005**; 96:371-374

Durán-Agüero S, Fernández-Godoy E, Fehrmann-Rosas P, Delgado-Sánchez C, Quintana-Muñoz C, Yunge-Hidalgo W, Fuentes-Fuentes J. Menos horas de sueño asociado con sobrepeso y obesidad en estudiantes de nutrición de una universidad chilena. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* **2016**; 33: 264-268

Duvnjak M, Lerotić I, Baršić N, Tomašić V, Jukić L V, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* 2007; 13: 4539

Edreva A, Velikova, V, Tsonev, T Gürel, A Aktas, L Gesheva E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiology* **2008**; 34: 67-78

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **2010**; 50: 679-689

Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical chemistry* **2008**; 54: 945-955.

Ferrari S. Biological elicitors of plant secondary metabolites: mode of action and use in the production of nutraceuticals. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* **2010**; 698:152-166

Ferre P, Foufelle F. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochemical Journal* **2002**; 366: 377-391

Figuroa-Pérez M G, Rocha-Guzmán N E , Mercado-Silva E, Loarca-Piña G, Reynoso-Camacho R. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry* **2014**; 156:273-278

Figuroa-Pérez M G, Gallegos-Corona M A, Ramos-Gomez M, Reynoso-Camacho R. Salicylic acid elicitation during cultivation of the peppermint plant improves anti-diabetic effects of its infusions. *Food & Function* **2015**; 6:1865-1874

GARCIA C A R. (2018). Infusiones de hierbabuena (*Mentha piperita* y *Mentha spicata*) tratada con quitosano y ácido salicílico y su efecto sobre la protección in vivo de esteatosis hepática en un modelo de obesidad. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Querétaro, México

Hernández Mendoza A. (2012). Efecto de infusiones comerciales sobre las alteraciones renales en un modelo de obesidad inducida. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Querétaro, México

Hernando A B, Foncillas J P. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, **2010**; 22:259-271

Houten S M, Wanders R J. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease* **2010**; 33: 469-477

Kang G, Li G, Guo T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. *Acta physiologiae plantarum* **2014**; 36: 2287-2297

Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1997**; 61: 102-104

Khan M I R, Fatma M, Per T S, Anjum N A, Khan N A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science* **2015**; 6:462

Khan W, Prithiviraj B, Smith D L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* **2003**; 160:859-863

Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* **2001**; 25:402-408

Lomelí de la Rosa S A. (2011). Efecto de infusiones herbales comerciales y naturales sobre alteraciones en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo en un modelo de obesidad. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

López Oliva E, Martínez E M. SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, **2014**; 80:14-48

Nagle C A, Klett E L, Coleman R A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *Journal of lipid research* **2009**; 50:74-79

Manzur F, Alvear C, Alayón A. Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease. *Rev Colomb Cardiol*, **2010**; 17:207-213

McCullough A J. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease* **2004**; 8: 521-533.

McKay D L, Blumberg J B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research* **2006**; 20: 619-633

Moyer V A. Screening for and management of obesity in adults: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine* **2012**; 157: 373-378

Murillo E (2002). Estudio Antioxidantes de Bebidas. Actividad antioxidante de bebidas de frutas y de té comercializadas en Costa Rica. Instituto de Alimentación y Nutrición. Universidad de Panamá

Namdeo A G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* **2007**; 1:69-79

NOM-008-SSA3-2010 NORMA Oficial Mexicana, LA OBESIDAD, S. Y., & GENERAL, C. D. S. Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud. *NORMA*, 52: 923-3325

OMS (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. En WHO. Technical Report Series, No. 894. World Health Organization, Geneva

Parnham M J, Kesselring K. Rosmarinic acid. *Drugs Future* **1985**; 10: 756-7

Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem* **2003**; 37:91-102

Ramsay RR, Gandour RD, Van der Leij FR. Enzimología molecular de la transferencia y el transporte de carnitina. *Biochim Biophys Acta* **2001**; 1546: 21–43

Rivera J A, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas C A., Popkin B M, Willett W C. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Boletín médico del Hospital infantil de México* **2008**; 65: 208-237

Roat C, Ramawat KG. Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnol Rep* **2009**; 3:135-138

Sánchez G R., Mercado E C, De la Cruz H R, Pineda E G. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo* **2013**; 12: 90-95

Van der Leij FR, Huijkman NC, Boomsma C, Kuipers JR, Bartelds B. Genómica de los genes de la carnitina aciltransferasa humana. *Mol Genet Metab* **2000**; 71:139–153

Vivanco J M, Cosio E, Loyola-Vargas V M, Flores H E. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia* **2005**; 341:68-75

Wilken D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Gómez R, Schmeda G, Gerth A. Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. Springer Dordrecht **2005**; 5:525-537

Xu C, Zhang Y, Zhu L, Huang Y, Lu J. Influence of Growing Season on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Grape Berries from Vines Grown in Subtropical Climate. *J Agric Food Chem* **2011**; 9:1078–1086

Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Agric Food Chem* **2001**; 49: 5165– 5170