



---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA  
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS TERPENOS MAYORITARIOS DE  
*Callistemon citrinus* EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASAS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**QUE PRESENTA  
BIÓL. LUIS ALBERTO AYALA RUIZ**

**Directora de tesis  
DRA. PATRICIA RÍOS CHÁVEZ**

**Morelia, Michoacán, abril de 2022**



**LA INVESTIGACION REALIZADA TUVO LUGAR EN EL LABORATORIO DE FITOBIOQUÍMICA PERTENECIENTE A LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORIA Y DIRECCIÓN DE LA D.C. PATRICIA RÍOS CHÁVEZ**



**LABORATORIO DE FITOBIOQUÍMICA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la D.C. Patricia Ríos Chávez por la paciencia, empeño, dedicación y apoyo a lo largo de mi formación profesional, considero que su asesoría fue indispensable para realizar esta investigación de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada en mis estudios de posgrado.

A los miembros de mi comité sinodal (DR. ASDRUBAL AGUILERA MÉNDEZ, DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA, DR. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ Y A LA DRA. BERENICE YAHUACA JUÁREZ) por sus aportaciones y conocimientos otorgados en mi formación.

A los profesores y amigos que me apoyaron en la licenciatura, en especial a la MC. MARIA DEL ROSARIO ORTEGA MURILLO, MC. IDOLINA MOLINA LEON y al DR. JOSE LUIS ABREGO ARANDA, considero que sin su ayuda no habría llegado hasta donde estoy.

A mi madre y a mis hermanos por ser siempre una fuente de inspiración, el apoyo es incondicional para lograr objetivos y ustedes me lo proporcionaron cada día.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por su amistad, tanto a los que conocí en esta nueva etapa, así como a los que conocí a lo largo de mi vida.

¡Muchas gracias a todos!

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
<b>2.1 Producción de especies reactivas de oxígeno con una dieta alta en grasa.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Biomarcadores de estrés oxidativo .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Lipoperoxidación .....	5
2.2.2 Glutación reducido .....	6
2.2.3 Paraoxonasa 1 .....	7
2.2.4 Productos de la oxidación avanzada de proteínas.....	7
<b>2.3 Mecanismos de inflamación ocasionados por dietas altas en grasa .....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Marcadores de inflamación en la obesidad.....	10
<b>2.4 Compuestos antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5 <i>Callistemon citrinus</i> .....</b>	<b>13</b>
2.5.1 1,8-Cineol.....	14
2.5.2 Limoneno.....	15
2.5.3 $\alpha$ -Terpineol .....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO GENERAL .....	18
<b>5.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	19
7. RESULTADOS.....	20
<b>7.1 CAPÍTULO I. Efecto de los terpenos mayoritarios de <i>Callistemon citrinus</i> sobre los parámetros morfométricos y valores de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. ....</b>	<b>20</b>
<b>7.2 CAPÍTULO II. Efecto de los terpenos mayoritarios de <i>Callistemon citrinus</i> sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. ....</b>	<b>32</b>
<b>7.3 CAPÍTULO III. Efecto de los terpenos mayoritarios de <i>Callistemon citrinus</i> sobre la deposición de grasa y los niveles de IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, adiponectina y leptina en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. ....</b>	<b>47</b>

<b>8. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	61
<b>9. CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	64
<b>10. REFERENCIAS GENERALES</b> .....	65
<b>11. ANEXOS</b> .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Mecanismos de acción de los terpenos mayoritarios de <i>C. citrinus</i> de acuerdo con lo reportado en diversas investigaciones.	17
<b>Figura 2.</b> Estrategia experimental	19
<b>Figura 3.</b> Peso corporal de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales	26
<b>Figura 4.</b> Ingesta de alimento de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales	26
<b>Figura 5.</b> Concentración plasmática de triacilglicéridos en sangre de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales	29
<b>Figura 6.</b> Concentración plasmática de glucosa en sangre de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales	30
<b>Figura 7.</b> Concentración plasmática de colesterol en sangre de las ratas en los diferentes tratamientos experimentales	30
<b>Figura 8.</b> Niveles de MDA en los diferentes tratamientos experimentales	39
<b>Figura 9.</b> Niveles de HNE en los diferentes tratamientos experimentales	40
<b>Figura 10.</b> Niveles de GSH en los diferentes tratamientos experimentales	41
<b>Figura 11.</b> Niveles de PON1 en los diferentes tratamientos experimentales	42
<b>Figura 12.</b> Niveles de AOPP en los diferentes tratamientos experimentales	43
<b>Figura 13.</b> Estudio histológico de los diferentes tratamientos experimentales	54
<b>Figura 14.</b> Niveles de IL-6 en los diferentes tratamientos experimentales	60
<b>Figura 15.</b> Niveles de leptina en los diferentes tratamientos experimentales	60
<b>Figura 16.</b> Niveles de adiponectina en los diferentes tratamientos experimentales	61
<b>Figura 17.</b> Niveles de TNF- $\alpha$ en los diferentes tratamientos experimentales	61
<b>Figura 18.</b> Mecanismo de acción de los terpenos mayoritarios de <i>C. citrinus</i> en un modelo de DAG	67

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Ejemplos de plantas con capacidad antioxidante	13
<b>Cuadro 2.</b> Modelo experimental	23
<b>Cuadro 3.</b> Índice de Lee y adiposidad en los diferentes tratamientos experimentales	27

## RESUMEN

Las dietas altas en grasas (DAG) conllevan a un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, lo cual incrementa la mortalidad en individuos con esa condición. El aumento de las grasas saturadas conduce a que se activen varias rutas de señalización que promueven un aumento en el estrés oxidativo teniendo como consecuencia una inflamación en diferentes tipos celulares. Se usaron 36 ratas Wistar, divididas en 6 grupos, con una n=6 para cada grupo. El grupo I fue el control, el grupo II correspondió a la DAG (63 % de alimento Purina® Rodent Chow, 41.66% de grasas (vegetal y animal) y 16.66 % de sacarosa). Los grupos III, IV, V, VI se alimentaron con la DAG más la administración oral diaria durante 15 semanas de los terpenos (1-8-cineol a 0.88 mg/kg, limoneno a 0.43 mg/kg,  $\alpha$ -terpineol a 0.32 mg/kg, y la mezcla terpénica de todos, respectivamente). Una vez terminado el modelo experimental, se midieron los parámetros morfométricos y los valores de glucosa, triacilglicéridos y colesterol en sangre. Se sacrificaron los animales con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una concentración de 120 mg/kg de peso. Se extrajo el hígado para determinar los niveles de malodialdehído (MDA), hidroxialquenos (HNE), paraoxanasa (PON1), glutatión reducido (GSH), productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), adiponectina y leptina. Los resultados mostraron que las ratas administradas con los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* no exhiben diferencias significativas en el peso de los animales, índice de Lee y colesterol. Sin embargo, tienen efecto regulador en los niveles de triacilglicéridos, glucosa, índice de adiposidad, ingesta de comida, MDA, HNE, PON1, AOPP, GSH, TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponectina y leptina en comparación del grupo de la DAG ( $P \geq 0.05$ ). En conclusión, los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* tienen potencial como antioxidantes, además de tener un efecto antiobesogénico para ser usados en un tratamiento preventivo contra el estrés oxidativo generado durante la obesidad.

**Palabras clave:** Obesidad, estrés oxidativo, compuestos terpénicos, antioxidantes.

## ABSTRACT

High-fat diets (HFD) lead to a higher risk of developing metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular diseases, which increases mortality in individuals with this condition. The increase in saturated fats leads to the activation of various signaling pathways that promote an increase in oxidative stress that results in inflammation in different cell types. 36 Wistar rats, divided into 6 groups of rats, with n=6 for each group, were used. Group I was the control, group II was the HFD (63% Purina® Rodent Chow food, 41.66% fat (vegetable and animal), and 16.66% sucrose). Groups III, IV, V, VI were fed with the DAG plus the daily oral administration of the terpenes (1-8-cineol at 0.88 mg/kg, limonene at 0.43 mg/kg,  $\alpha$ -terpineol at 0.32 mg/kg, and the terpene mix of all), for 15 weeks. Once the experimental model was finished, the morphometric parameters and the values of glucose, triacylglycerides, and cholesterol in blood were measured. The animals were sacrificed with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital at a concentration of 120 mg/kg of weight. The liver was extracted to determine the levels of malondialdehyde (MDA), hydroxyalkenes (HNE), paraoxonase (PON1), reduced glutathione (GSH), advanced protein oxidation products (AOPP), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), adiponectin and leptin. The results showed that the rats administered with the main terpenes of *C. citrinus* did not show significant differences in the weight of the animals, Lee index, and cholesterol, however, they showed a regulatory effect on the levels of triacylglycerides, glucose, food intake, MDA, HNE, PON1, AOPP, GSH, TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponectin, and leptin compared to the DAG group ( $P \geq 0.05$ ). The main terpenes of *C. citrinus* showed potential as antioxidants to be used in preventive treatment against oxidative stress generated during obesity.

**Keywords:** Obesity, oxidative stress, terpenic compounds, antioxidants.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las grasas son una fuente de energía presente en plantas, animal y otros organismos. Estas proporcionan ácidos grasos para la síntesis de membranas, modificaciones de proteínas, carbohidratos y compuestos de señalización (Spector, 1999), sin embargo, las dietas altas en grasas causan diversos problemas de salud dependiendo de la composición de ácidos grasos. Se ha reportado que las grasas tienen una respuesta sobre el estrés oxidativo, por lo que estas se han estudiado formando una amplia gama de parámetros de estrés oxidativo (Beltowski *et al.*, 2000; Folmer *et al.*, 2003). Se ha determinado que altos niveles de grasas poliinsaturadas en la dieta tales como ácidos de la serie 3 (n-3) conforman la membrana de diversos tipos celulares, los cuales son susceptibles a la peroxidación en presencia de radicales libres. Existe una interrogante sobre estas dietas ¿Hay una mayor susceptibilidad de las membranas a la peroxidación o una mayor cantidad de peroxidación lipídica? En este sentido, es importante mencionar que los lípidos no son los únicos compuestos dañados por los radicales libres, también existen biomoléculas que pueden dañarse tales como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos afectando el funcionamiento celular, existen diversas patologías producidas por estos, entre las que destacan el cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Walczewska *et al.*, 2010).

En un estudio reciente se evidenció que el extracto de *Callistemon citrinus* tiene un efecto modulador del peso y de las enzimas antioxidantes en un modelo de ratas bajo una dieta hipercalórica (Ortega-Perez *et al.*, 2020). En otros estudios se ha reportado que *Callistemon citrinus* tiene actividad antioxidante en el hígado, riñón, corazón y colon contra el estrés oxidativo generado en un modelo de cáncer de colon con 1,2-dimetilhidrazina (Ortega-Pérez 2017; López-Mejía, 2018; Magaña-Rodríguez, 2018; López-Mejía *et al.*, 2019). El extracto de esta planta tiene un alto contenido de terpenos, los terpenos mayoritarios que destacan de este extracto son el 1,8-cineol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol, a los cuales se les ha atribuido sus efectos benéficos como una alta capacidad antioxidante, propiedades antiinflamatorias, analgésicas, hepatoprotectoras, entre otras. Considerando estos efectos benéficos, los terpenos mencionados se postulan como buenos candidatos para ser incorporados en un producto natural que tenga un efecto

para controlar el peso corporal y el estrés oxidativo sin efectos secundarios o el menor riesgo. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la actividad antioxidante y antiobesogénica de los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Producción de especies reactivas de oxígeno con una dieta alta en grasa

A nivel mundial existen personas con diferentes hábitos alimenticios, en algunos países se tienen tendencias a consumir alimentos ricos en grasas con bajo valor nutricional. Las dietas altas en grasas aumentan la ingesta de alimentos y por consecuencia producen una mayor cantidad de energía, que conllevan a la expansión de tejido adiposo en el cuerpo habiendo también otras causas multifactoriales para un aumento de tejido adiposo tales como el estilo de vida sedentario, una mayor urbanización y riesgos psicosociales. Por las causas mencionadas se ha reportado una relación entre el aumento del tejido adiposo con la prevalencia de patologías como obesidad, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes mellitus tipo II (Miller *et al.*, 1990; Prewitt *et al.*, 1991; Klesges *et al.*, 1992; Kesh *et al.*, 2016).

Las dietas occidentales contienen al menos de 30 a 40 % de grasas, mientras que las dietas orientales típicas contienen al menos un 20 % de grasa. En estos porcentajes se ha determinado que la principal fuente de energía viene de los lípidos de los cuales se encuentran ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Las dietas altas en grasa con un alto contenido de grasa de cerdo o grasa vegetal se caracterizan por tener altos niveles de ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP), bajos niveles de ácidos grasos omega 6 (entre 9 y 10%) y niveles muy bajos de ácidos grasos omega 3 (menos del 1%) (Li *et al.*, 2018). Los tipos de grasas en la dieta determinan la composición de las biomembranas y los AGP son sustratos para las reacciones con los radicales libres conduciendo a la lipoperoxidación (Mehta *et al.*, 1994; Dröge, 2002).

Se ha reportado que la grasa de las dietas es un factor importante que promueve el exceso de la ingesta de comida y obesidad, en este sentido se ha sugerido que no todas las grasas pueden tener el mismo efecto sobre una condición de obesidad. En un estudio realizado con roedores se demostró que el tipo y la estructura de los lípidos ingeridos

repercuten en el metabolismo de los individuos. Las dietas que contienen un alto contenido de PUFA inducen un mayor apetito que las dietas altas en AGS lo que se ve reflejado en el peso. Esto puede deberse a la sustitución isoenergética de triacilglicerol en lípidos de cadena media por de cadena larga, ya que los ácidos de cadena media se oxidan, especialmente por el hígado, con menor rapidez (Diniz *et al.*, 2004).

## **2.2 Biomarcadores de estrés oxidativo**

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas con electrones que se unen rápidamente a moléculas cercanas, no obstante, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que contienen oxígeno que puede tener electrones desapareados o no, pero que son altamente reactivas en tejidos. Las principales ROS son anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), óxido nítrico ( $NO\cdot$ ). Bajas concentraciones de radicales libres, ROS y otras especies de nitrógeno son necesarias para una correcta señalización celular, así como un estado redox normal. Cuando se tienen elevados niveles de ROS y radicales libres sobrepasando los niveles de antioxidantes en el organismo se genera un estado de estrés oxidativo (Yu, 1994).

Durante un estado de estrés oxidativo se producen daños irreversibles en las biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), lo que causa modificaciones en su función afectando diversas funciones fisiológicas (Lachance *et al.*, 2001). Los procesos para cuantificar los radicales libres de manera directa son costosos, entre ellos destacan la resonancia electrónica, captura de radicales libres en tiempo real, entre otros, por lo que se ha optado por implementar técnicas más simples en las que se cuantifican los productos finales de los procesos oxidativos mediados por radicales libres para estimar el daño oxidativo (Halliwell y Whiteman, 2004).

Existen moléculas que se usan como marcadores de estrés oxidativo e inflamación, estos se usan como indicadores biológicos en patologías asociadas con la obesidad, entre los más comunes destacan microARN, biomarcadores inflamatorios, niveles de adipocinas, microbiota intestinal, valores séricos y niveles de nutrientes (Endalifer y Diress, 2020).

### 2.2.1 Lipoperoxidación

Los radicales libres y las ROS reaccionan con diferentes biomoléculas, entre ellas destacan los lípidos, esto ocasiona daños en las membranas biológicas que traen como consecuencia la alteración de la fluidez y permeabilidad, además de modificar los niveles de las enzimas, proteínas y canales asociados a estas, repercutiendo en la estructura y función celular (Fainstein y Aguilar-Maldonado, 2008).

En la lipoperoxidación existen compuestos que actúan como indicadores de daño como el malondialdehído (MDA), lípidos hidroperóxidos, dienos conjugados, 4-hidroxinonal (4-HNE) y los F2-isoprostanos (8-epiPGF2a). Los hidroperóxidos son generados en las primeras etapas de la peroxidación de lípidos, mientras que el MDA o F2-isoprostanos se forman al final de una larga fase oxidativa (Halliwell y Whiteman, 2004). La principal fuente de MDA en muestras biológicas es la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados con dos o más dobles enlaces, es por esto que la lipoperoxidación es un proceso autocatalítico y de propagación. Fisiológicamente el MDA a pH neutro como anión enolato tiene baja reactividad, además esta molécula es capaz de reaccionar con los ácidos nucleicos formando aductos (pirimido-[1,2- $\alpha$ ]purín-10(3H)-ona desoxirribosa), lo cual ha sido propuesto como mecanismo de mutación en el DNA. La lipoperoxidación se ha dividido para su estudio en 3 fases: iniciación, propagación y terminación (Del Rio y Pellegrini, 2005).

La iniciación es un proceso que se desencadena cuando alguno de los residuos de PUFAS en la membrana lipídica reacciona con una ROS retirando un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. Al terminar esta reacción el residuo del ácido graso queda como un radical libre centrado en carbono, este carbono reacciona con oxígeno molecular formando un radical peroxilo (ROO $\cdot$ ). Esta molécula inactiva a algunas enzimas por la oxidación de los aminoácidos presentes en ellas (metionina, lisina, cisteínas, histidina). La propagación inicia con el radical peroxilo, este reacciona con los hidrógenos de los otros lípidos de la membrana lipídica estableciendo una reacción en

cadena. Este radical también puede reaccionar al encontrarse con un metal de transición (Fe o Cu), el cual puede fraccionarse y producir más radicales peroxilo o un radical alcoxilo (RO·), este último reacciona de manera similar al otro radical propagando la lipoperoxidación. En la terminación culmina el proceso de la lipoperoxidación alterando la membrana y sus funciones principales como la fluidez y permeabilidad (Fainstein y Aguilar-Maldonado, 2008).

### **2.2.2 Glutación reducido**

El glutación (GSH) juega un papel importante en la detoxificación celular de las ROS, ya que reacciona directamente con los radicales y es donante de electrones para la reducción del peróxido por medio de la enzima glutación peroxidasa (GPx). Existe una relación entre el glutación reducido y oxidado, en la célula los niveles de estos son altos, ya que existe un mecanismo de regeneración de estos, sin embargo, los bajos niveles de glutación reducido actúan como un biomarcador de estrés oxidativo (Browne y Armstrong, 1998).

El GSH es un antioxidante endógeno importante en el metabolismo de diversos tipos celulares, este tiene un potencial redox normal GSH / GSSG mantiene las funciones de diversas proteínas y enzimas celulares, incluidas muchas de las que participan en la muerte celular y las cascadas de supervivencia. En muchas formas de enfermedades hepáticas, la reserva de GSH hepático se ve comprometida por el deterioro de la síntesis y el transporte y/o el consumo excesivo. La alteración de la homeostasis del GSH en el hígado no solo da lugar a ROS que oxidan las proteínas, ADN y lípidos, pero también altera múltiples vías de señalización que afectan el metabolismo intermedio, la supervivencia y la proliferación y por tanto contribuye a la patogenia de diversas enfermedades hepáticas. El GSH combate el estrés oxidativo en la célula de las ROS como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo (HO·). Estos surgen en niveles bajos como intermediarios cuando el oxígeno pasa por el complejo I y el complejo III de la cadena transportadora de electrones (CTE) en las mitocondrias. La familia de oxidasas (NOX) produce ROS en niveles basales para llevar

una correcta señalización celular. Sin embargo, el aumento excesivo de ROS surge comúnmente en condiciones asociadas con infección, inflamación, xenobióticos y estrés intracelular. Por lo que los niveles de glutatión reducido tienen una importancia en la patogénesis de la lesión de las células hepáticas (Yuan y Kaplowitz, 2009).

### **2.2.3 Paraoxonasa 1**

Existen enzimas antioxidantes que se producen principalmente de manera endógena en el hígado como la paraoxanasa 1 (PON 1) esta enzima se encuentra en el hígado, corazón, riñón, intestino pequeño, cerebro y pulmones. Esta es una glicoproteína hepática dependiente del calcio (Précourt *et al.*, 2011). La paraoxanasa 1 (PON1) tiene una actividad de esterasa y lactonasa asociada a HDL, se ha demostrado que posee propiedades antiaterogénicas, ya que protege las lipoproteínas y células arteriales contra la oxidación, hidrolizando peróxidos de lípidos como ésteres de colesterol y fosfolípidos oxidados específicos. La PON1 también inhibe la acumulación de fosfolípidos oxidados generados por el peroxinitrito, debido a la capacidad para hidrolizar los aldehídos de fosfatidilcolina (PC) y los isoprostanos de lisofosfatidilcolina (Rozenberg *et al.*, 2003).

Se determinó que los niveles de la PON1 sirven como un marcador de daño hepático (Ferré *et al.*, 2002). La PON1 tiene una alta actividad antioxidante, por lo que está involucrada en la inhibición de la lipoperoxidación de las LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Watson *et al.*, 1995; La Du, 1996; Mackness *et al.*, 1996; Aviram *et al.*, 1999). En varios modelos animales se ha observado que los niveles bajos de la PON1 están asociados con una gran susceptibilidad a la oxidación de las LDL lo cual conlleva a tener un alto riesgo de padecer aterosclerosis (Shih *et al.*, 1996). En investigaciones clínicas se ha visto que pacientes que cuentan con una actividad baja de la PON1 tienen enfermedades vasculares (Mackness *et al.*, 1996; Aviram *et al.*, 1999), por este motivo es que se ha considerado que la actividad de PON1 funciona como un marcador de enfermedades cardiovasculares en etapa temprana (Nguyen y Sok, 2003).

### **2.2.4 Productos de la oxidación avanzada de proteínas**

Los productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP) fueron descubiertos por primera vez en pacientes con insuficiencia renal crónica, desde entonces se ha determinado que los AOPP pueden desempeñar un papel como biomarcador en condiciones patológicas de diversas enfermedades involucradas con un aumento excesivo de ROS tales como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, etc. (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Kalousová *et al.*, 2004). Además, los AOPP se han usado para monitorear el estrés oxidativo en pacientes críticamente enfermos por sepsis o insuficiencia cardíaca. Varios estudios han demostrado que la albúmina de suero humano oxidada (oxi-HSA) es el componente principal de AOPP y el 51 % se elimina de la circulación por el hígado. Por tanto, se ha sugerido que el hígado es la principal vía de depuración plasmática de oxi-HSA y que a su vez se encarga de la eliminación de los AOPP (Liu *et al.*, 2012).

Los AOPP son los productos proteicos entrecruzados que contienen ditirosina formados durante un estado de estrés oxidativo, por la reacción entre las proteínas y los oxidantes clorados. Los AOPP aparecen como marcadores del estrés oxidativo asociado con cirrosis hepática, así como un verdadero mediador inflamatorio capaz de amplificar la activación de monocitos y neutrófilos, incluido en procesos como el estallido respiratorio. La unión de los AOPP con sus receptores, un ejemplo de ellos son los productos avanzados de glicosilación (RAGE), que inducen el estrés oxidativo, la liberación de citocinas e inflamación (Liu *et al.*, 2012).

### **2.3 Mecanismos de inflamación ocasionados por dietas altas en grasa**

La inflamación es un mecanismo de defensa normal que protege al organismo de infecciones y daño celular. Este proceso ayuda a contrarrestar daño por patógenos, está implicado en reparación de tejidos, así mismo ayuda a restaurar la homeostasis en sitios infectados o dañados. La inflamación se caracteriza por un enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor, e implica interacciones entre diversos tipos celulares con una serie de sustancias químicas que actúan como mediadores. Los mediadores más comunes son

las quimiocinas, eicosanoides, moléculas de adhesión y especies reactivas de oxígeno (Calder, 2011). La autorregulación de la respuesta inflamatoria implica la activación de mecanismos de retroalimentación negativa como la secreción de adipocinas antiinflamatorias (adiponectina, interleucina 4, 6, 10, 11 y 13), cascadas de señalización proinflamatorias inhibidas, desprendimiento de receptores para mediadores inflamatorios y activación de macrófagos. Las respuestas inflamatorias reguladas son esenciales para mantener la homeostasis en el organismo y mantener un correcto funcionamiento. Sin embargo, la inflamación patológica implica una pérdida de tolerancia y/o de procesos regulatorios en la que pueden producirse daños excesivos e irreparables en los tejidos y por consecuencia patologías. Estas enfermedades se caracterizan por tener concentraciones elevadas de marcadores inflamatorios, activadores de células inflamatorias en el sitio del daño tisular y en circulación sistémica los ejemplos de estas patologías incluyen la artritis reumatoide inflamatoria, enfermedades intestinales y asma. No obstante, cuando existe una inflamación crónica se encuentran concentraciones elevadas de marcadores inflamatorios en vía sistémica. Se ha reportado que la inflamación crónica está relacionada con patologías como la obesidad, el síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular (Calder *et al.*, 2009).

Los eicosanoides son un grupo de moléculas que se forman a partir de la oxidación de PUFAs de 20 carbonos, estos son mediadores y reguladores de la inflamación. Estas moléculas se generan a partir del ácido araquidónico por diversos procesos metabólicos y estos dan origen a prostaglandinas (PG), tromboxanos, leucotrienos (LT) y a otros derivados oxidados. Los eicosanoides están involucrados en modular la intensidad y duración de las respuestas inflamatorias (Lewis *et al.*, 1990; Tilley *et al.*, 2001), así como estímulos específicos y con frecuencia tienen efectos opuestos. Por lo tanto, el resultado fisiopatológico dependerá de las células presentes, la naturaleza del estímulo, el tiempo de generación del eicosanoide, las concentraciones de estos y la sensibilidad en las células y tejidos diana de los eicosanoides generados. Debido a la cantidad relativamente alta de ácido araquidónico en la membrana de las células, los fosfolípidos están involucrados en el proceso de inflamación (Levy *et al.*, 2001; Gewirtz *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Marcadores de inflamación en la obesidad

El tejido adiposo es un órgano que tiene como función primaria el almacenamiento de los triacilglicéridos, liberar ácidos grasos libres y glicerol durante el ayuno, además tiene la función de actuar como un órgano endocrino que cumple diversas funciones por las proteínas (adipocinas) que secreta, ya que actúan como hormonas (Vendrell *et al.*, 2004; Makki *et al.*, 2013). Se ha determinado en estudios que las personas delgadas preferentemente secretan adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina, factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), interleucina (IL) -10, IL-4, IL-13, antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), entre otras. Por el contrario, el tejido adiposo en personas obesas libera principalmente adipocinas entre las que se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6, leptina, resistina, angiotensina II, adiponectina, grelina y vitafatina. (Ouchi *et al.*, 2011).

El TNF- $\alpha$  es una adipocina proinflamatoria de 157 aminoácidos se identifica como un producto proinflamatorio del tejido adiposo que se induce en modelos de diabetes y obesidad, proporcionando evidencia de un vínculo funcional entre la obesidad y la inflamación. Se ha reportado que la expresión de TNF- $\alpha$  aumenta en el tejido adiposo en modelos de obesidad y diabetes tipo 2 con animales. La inhibición de la señalización inducida por TNF- $\alpha$  en animales obesos produce una mejora en la sensibilidad a la insulina en los tejidos musculares y adiposos. El TNF- $\alpha$  es secretado por células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, células NK y leucocitos polimorfonucleares, además es secretado por otro tipo de células como los adipocitos (Hotamisligil *et al.*, 1993; Chen y Goeddel, 2002).

La leptina fue identificada como una proteína que es secretada específicamente por el tejido adiposo, que tiene como función regular el gasto energético y la ingesta de alimentos de forma endocrina (Zhang *et al.*, 1994). La leptina es estructuralmente similar a la familia de citocinas helicoidales que incluyen IL-2, hormona del crecimiento 1. Se ha reportado que tiene actividades proinflamatorias ya que esta aumenta la producción de TNF- $\alpha$  y IL-6 por monocitos. Los niveles de leptina están correlacionados con la cantidad

de tejido adiposo, en grandes cantidades de tejido adiposo existe un aumento de estrés oxidativo e inflamación que activan la transcripción de genes para las proteínas PTP1B, SOCS3, LEPRB y TCPTP las cual evitan la activación de los receptores de leptina desencadenando una resistencia y una hiperleptinemia (Friedman y Halaas, 1998; Coppari y Bjørnbæk, 2012). En los monocitos la leptina estimula la producción de ROS, promueve la proliferación celular y las respuestas migratorias. Los niveles de leptina en el suero y tejidos adiposo aumentan la respuesta a estímulos proinflamatorios, incluidos TNF- $\alpha$  y lipopolisacáridos (LP). De acuerdo con estos hallazgos, la deficiencia de leptina protege contra el daño hepático en modelos de hepatitis mediada por células TH1 (Ouchi *et al.*, 2011).

La IL-6 es una adipoquina proinflamatoria que está involucrada con la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad. Los niveles plasmáticos de IL-6 se relacionan con la cantidad de tejido adiposo en las poblaciones humanas, de modo que se observan niveles elevados de IL-6 en sujetos obesos y la pérdida de peso conduce a una disminución en los niveles de IL-6 (Fried *et al.*, 1998; Ziccardi *et al.*, 2002; Esposito *et al.*, 2003). Los niveles plasmáticos de IL-6 aumentan en pacientes con diabetes tipo 2, y los niveles elevados de IL-6 son predictivos del desarrollo de diabetes tipo 2. Se estima que aproximadamente un tercio de la IL-6 circulante total es producida por los tejidos adiposos, y es posible que el aumento de la secreción de IL-6 en condiciones de obesidad contribuya a la disfunción metabólica (Fried *et al.*, 1998; Pradhan *et al.*, 2001). Por otro lado, la administración de IL-6 en ratones elimina la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa en el hígado. Por el contrario, la deficiencia de IL-6 exacerba la resistencia a la insulina hepática y la inflamación en ratones alimentados con una dieta alta en calorías (Kim *et al.*, 2004; Matthews *et al.*, 2010).

La adiponectina es sintetizada exclusivamente por los adipocitos y está presente en niveles elevados en la sangre. Los niveles de adiponectina en el plasma y el tejido adiposo están disminuidos en los individuos obesos en comparación con los delgados. De acuerdo con lo anterior, la producción de adiponectina por los adipocitos es inhibida por factores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-6, así como por hipoxia y estrés oxidativo

(Ryo *et al.*, 2004; Hosogai *et al.*, 2007). En diversos estudios clínicos revelan una relación entre los niveles de adiponectina y la disfunción metabólica ligada a la obesidad. Los niveles bajos de adiponectina plasmática se correlacionan con la acumulación de grasa visceral y están disminuidos en pacientes con diabetes tipo 2, no obstante, los niveles altos de adiponectina se asocian con un menor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. Por lo tanto, la adiponectina se expresa en niveles altos en organismos delgados con adipocitos funcionales, pero su expresión se ve reducida cuando existen adipocitos disfuncionales asociados con patologías como la obesidad (Ryo *et al.*, 2004; Ouchi *et al.*, 2011).

#### **2.4 Compuestos antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal**

En la actualidad existe un importante número de compuestos que son obtenidos de productos naturales, no obstante, se ha intentado buscar plantas que presenten compuestos con propiedades biológicas para ser usado en el desarrollo de nuevos fármacos, complementos o aditivos alimentarios para proveer protección frente a diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer (Arredondo-Espinoza, 2011). Se han reportado extractos de plantas con actividad antioxidante en modelos animales (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Ejemplos de plantas con capacidad antioxidante.

<b>Especie de planta</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
<i>Camellia sinensis</i>	Protege contra el estrés oxidativo en el musculo esquelético en un modelo de dieta alta en grasas.	Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
<i>Ocimum basilicum</i>	Capacidad antioxidante y efecto hipolipidémico en un modelo de dieta alta en grasas.	Umar <i>et al.</i> , 2012
<i>Thymbra spicata</i> L. var. <i>spicata</i>	Capacidad antioxidante y hipocolesterolémico en un modelo de dieta alta en grasas.	Akkol <i>et al.</i> , 2009
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Efecto antihipertensivo, antidiabético, antioxidante, hipocolesterolémico en un modelo de dieta alta en grasas.	el Imane Harrat <i>et al.</i> , 2019
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Efecto antiobesogénico y hipocolesterolémico en un modelo de dieta alta en grasas.	Ibarra <i>et al.</i> , 2011
<i>Averrhoa Carambola</i>	Actividad antioxidante y hipolipidémica en un modelo de dieta alta en grasas.	Aladaileh <i>et al.</i> , 2019

## **2.5 *Callistemon citrinus***

*Callistemon citrinus* es una planta que ha sido empleada en la medicina tradicional de Australia y países del sur de Asia. En los últimos años han sido evaluadas las propiedades farmacológicas de esta planta corroborando su actividad antiinflamatoria, antidiabética, hipolipidémica y antioxidante, entre otras (Kumar *et al.*, 2007). A pesar de estas propiedades, en México su único uso es el ornamental, por lo que son recientes las investigaciones biológicas y farmacológicas realizadas para esta planta en nuestro país.

Los estudios realizados por Lopez-Mejia en el 2015 han demostrado que el extracto de *C. citrinus* contienen un alto potencial antioxidante *in vitro*, que no poseen toxicidad aguda y subaguda a dosis de 1000 mg/kg durante 28 días. Además, se ha observado que tiene un efecto hepatoprotector y antioxidante *in vivo* por lo que es una buena candidata para su estudio en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (López-Mejía, 2015; Pérez-Mora, 2016). En el 2020, Ortega-Pérez determinó el efecto del extracto del *C. citrinus* en ratas obesas, se demostró el efecto antioxidante y anti-obesogénico del extracto, no obstante, se desconoce el compuesto que induce este efecto. El extracto de *C. citrinus* demostró tener un alto número de compuestos terpénicos algunos de ellos de interés farmacológico como el 1,8-cineol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol (Petronilho *et al.*, 2013).

### **2.5.1 1,8-Cineol**

El 1,8-cineol conocido comúnmente como eucaliptol, es un monoterpeno bicíclico que se encuentra presente en las plantas del género *Eucalyptus*, así como en menor cantidad en plantas odoríferas como el romero, tomillo, salvia, laurel e incluso en algunos extractos de frutos (Azerad, 2014). Debido al olor similar al del mentol este compuesto es usado para aromatizar alimentos, cosméticos y limpiadores domésticos, al igual que con otros terpenos, el 1,8-cineol se ha usado en productos farmacéuticos para tratar tos, bronquitis y dolores musculares. De igual manera se le han atribuido propiedades analgésicas, antiinflamatorias y hepatoprotectoras, así como de ayudar en la colitis aguda inducida por ácido trinitro-bencenosulfónico en ratas y en un modelo inflamatorio intestinal (Santos y Rao, 2000). En otro estudio se observó que presenta una actividad antioxidante y disminución de colesterol en el pez cebra (Cho, 2012). También se ha visto que incrementa los niveles de las enzimas GPX, CAT Y SOD en hígado de ratas inducidas a un estrés oxidativo (Santos *et al.*, 2004).

Por otro lado, se han determinado propiedades antiinflamatorias del 1,8-cineol en varios modelos animales de lesión pulmonar aguda, asma e inflamación del colon y síndrome de dificultad respiratoria aguda. La administración intragástrica de 100 mg/kg de 1,8-

cineol redujo de 40 a 50 % el número de neutrófilos y macrófagos en comparación con el grupo control (Bastos *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y NF-kB en el tejido pulmonar se redujeron en un 50 % en ratones administrados con 1,8-cineol a una concentración de 0.5 mg/kg (Brown *et al.*, 2017).

Se ha reportado el uso de 1,8-cineol en estudios farmacocinéticos en análisis *in vivo* e *in vitro*. Usando una concentración oral de 200 mg/kg en conejos dio como resultado que la duración de la concentración plasmática de este compuesto fue de 1 hora, por lo que se tiene una buena absorción intestinal de este compuesto. En otro estudio con un modelo de roedores se determinó que el 1,8-cineol se somete a modificaciones oxidativas, lo cual da como resultado la producción de 2-hidroxi-1,8-cineol y 3-hidroxi-1,8-cineol (Miyazawa *et al.*, 2001; Bhowal y Gopal, 2015).

### **2.5.2 Limoneno**

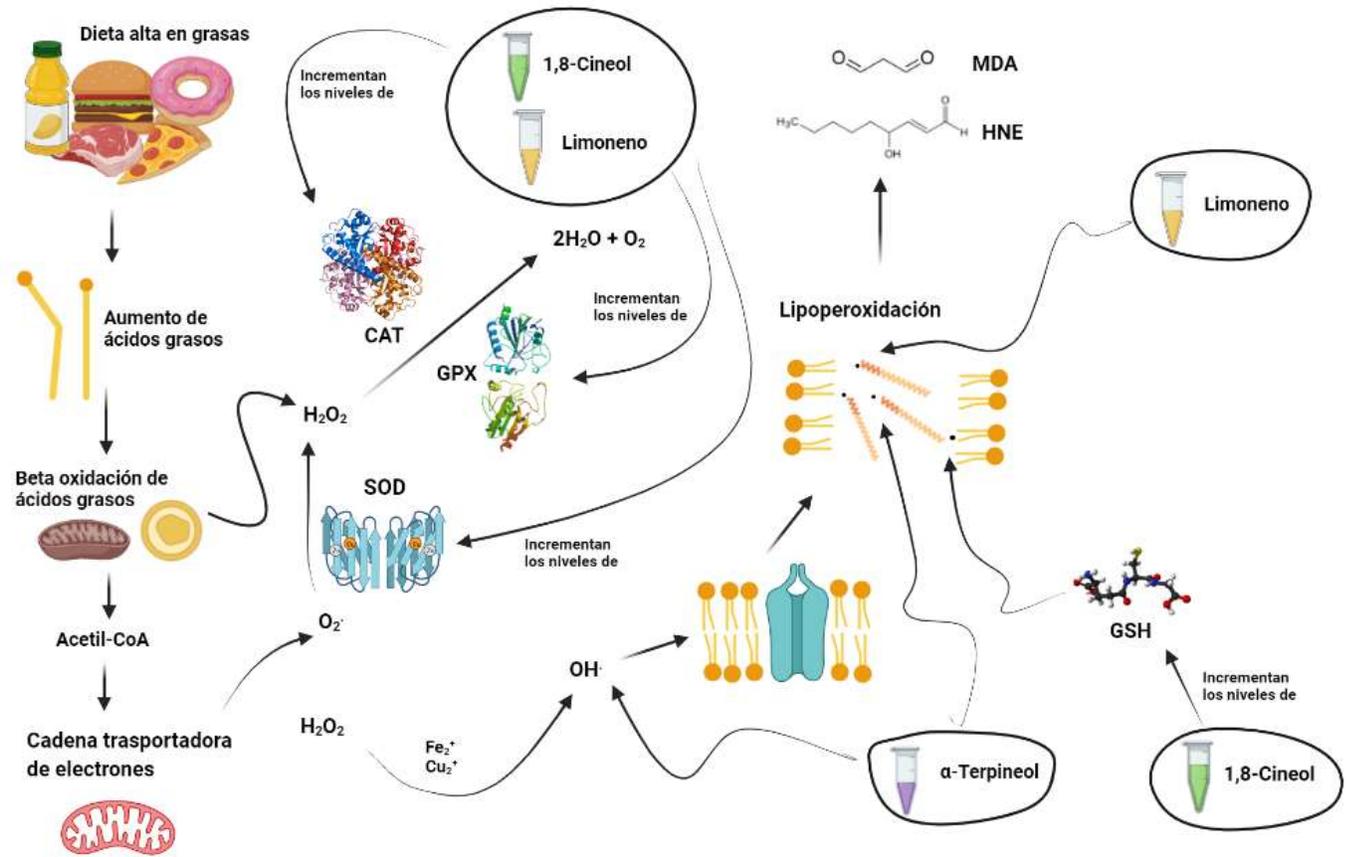
El limoneno es un compuesto con una estructura básica de isopreno, un estudio en aceite esencial de apio indicó que contiene 74.6 % de limoneno mostrando una alta actividad inhibitoria hacia el malonaldehído (MDA) (Wei, 2007). En otros estudios se ha visto que el limoneno presenta propiedades analgésicas en el aceite de *Dracocephalum Kotschy* (Golshani *et al.*, 2004). El limoneno presentó una actividad antioxidante en un ensayo de DPPH atrapando radicales libres y se demostró que en concentraciones bajas (entre 10 y 50 mg/ml) aumenta la actividad de la catalasa y glutatión peroxidasa, mientras que a concentraciones altas (100 mg/ml) presento un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Roberto *et al.*, 2010).

### **2.5.3 $\alpha$ -Terpineol**

El  $\alpha$ -terpineol es uno de los monoterpenos principales usados como componentes químicos de los aceites esenciales de las plantas medicinales con propiedades terapéuticas, estos compuestos cuentan con diversas propiedades farmacológicas como antidepresivos, anticonvulsivos, sedantes (Oliveira *et al.*, 2012). También se ha

observado que modula los niveles de óxido nítrico (NO) como un marcador importante de estrés oxidativo (Ribeiro *et al.*, 2010). Se ha reportado que  $\alpha$ -terpineol tiene un efecto antinociceptivo debido a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2, así mismo interviene en la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, prostaglandinas E2, interleucina-1 $\beta$  y factor nuclear kappa B (NF-KB) (Held *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2010; Quintans *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2012).

En la **figura 1** se observa una ruta por la cual los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* podrían tener un efecto antioxidante. El 1,8-cineol y limoneno incrementan los niveles de las enzimas GPX, CAT Y SOD en ratas inducidas a un estrés oxidativo en el hígado de ratas. Por otro lado, el  $\alpha$ -terpineol cuenta con una actividad antioxidante contra los radicales peroxilo en un ensayo DPPH por lo que pudiera estar actuando sobre los radicales hidroxilo. Además, se ha determinado que el limoneno tiene una alta actividad inhibitoria hacia el malondialdehído (MDA) por lo que pudiera inhibir la formación de compuestos de la lipoperoxidación de lípidos (Golshani *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Held *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2010; Roberto *et al.*, 2010; Quintans *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Mecanismos de acción de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* propuesto con conforme a lo reportado en la literatura (Golshani *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Held *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2010; Roberto *et al.*, 2010; Quintans-Júnior *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2012).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las dietas altas en grasa se caracterizan por ocasionar un aumento del tejido adiposo y presencia de estrés oxidativo que da como resultado un estado de inflamación. En estudios previos se ha demostrado el efecto antioxidante del extracto de *C. citrinus*, sin embargo, no se conoce el efecto de los terpenos mayoritarios del extracto, por lo que determinar el efecto antioxidante de estos terpenos puede generar alternativas para revertir el daño oxidativo generado durante la ingesta de una dieta alta en grasas.

### **4. HIPÓTESIS**

Los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* son los responsables de la actividad antioxidante durante la ingesta de una dieta alta en grasas.

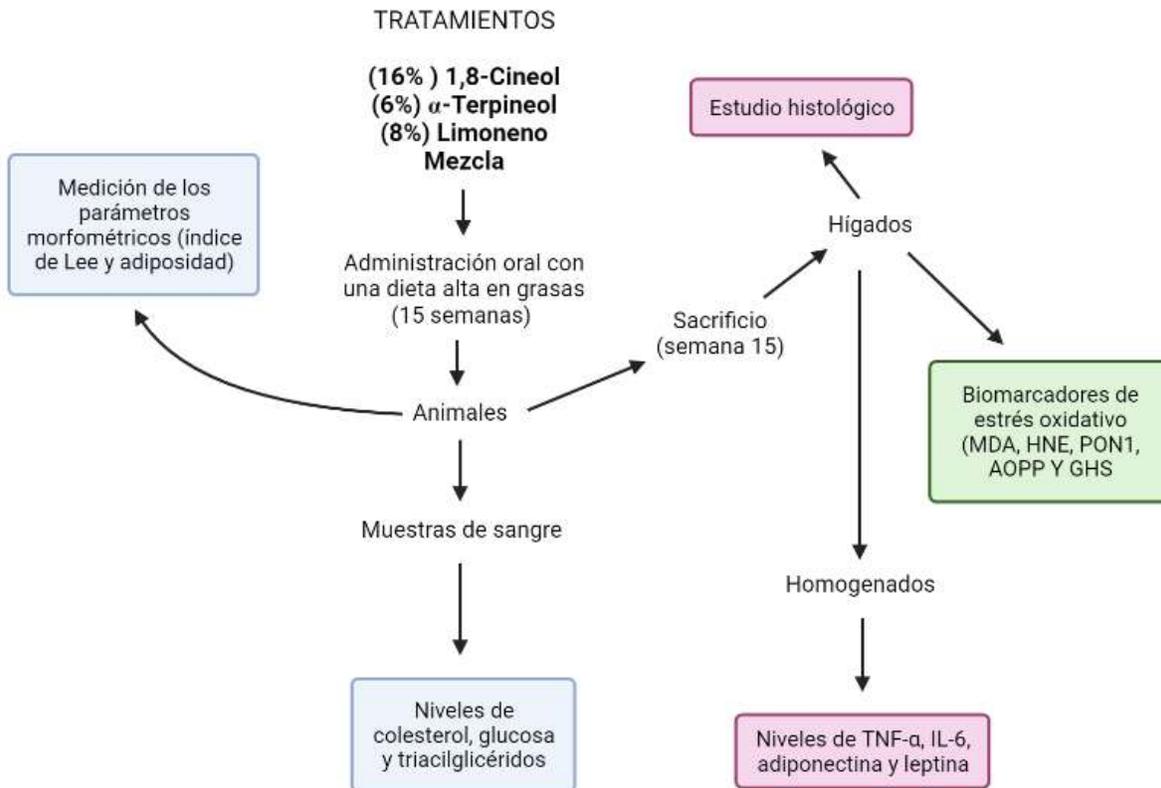
### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad antioxidante de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasas.

#### **5.1 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla de estos sobre los parámetros morfométricos y valores séricos de triacilglicéridos, glucosa y colesterol de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.
2. Evaluar el efecto de 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla de estos sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.
3. Identificar el efecto de 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla en el tejido hepático mediante cortes histológicos en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.
4. Determinar el efecto del 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla sobre los marcadores de inflamación (TNF- $\alpha$ , IL-6, adipocinas y leptina) en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. RESULTADOS

### 7.1 CAPÍTULO I. Efecto de los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* sobre los parámetros morfométricos y valores de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas

#### RESUMEN

Las dietas altas en grasas (DAG) conllevan a desarrollar patologías relacionadas con una mala alimentación como obesidad y enfermedad cardiovascular. *Callistemon citrinus* es una planta a la que se le han atribuido diversas actividades biológicas, en un modelo de dieta hipercalórica en ratas más la administración oral diaria con el extracto de hoja a una concentración de 250 mg/kg mostró una disminución del peso en los individuos. En la composición de este extracto se ha determinado un alto contenido de terpenos (1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno). En este estudio se determinó el efecto de los terpenos sobre los valores séricos y parámetros morfométricos (índice Lee y de adiposidad) en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas. Se usaron 6 grupos de ratas con una n=6 para cada grupo, el grupo I fue el control, el grupo II fue la DAG (63% de alimento Purina® Rodent Chow, 41.66% de grasas y 16.66% de sacarosa). Los grupos III, VI, V, VI se alimentaron con la DAG más la administración oral diaria de los terpenos (1-8-cineol a 0.88 mg/kg; limoneno a 0.43 mg/kg;  $\alpha$ -terpineol a 0.32 mg/kg y la mezcla terpénica de todos, respectivamente). Los resultados obtenidos mostraron que la dieta alta en grasa que se les dio a los animales, no contribuyó a aumentar los niveles de colesterol y peso. Sin embargo, otros parámetros sí se modificaron. Los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* disminuyeron la ingesta de alimento, los niveles de triacilglicéridos y glucosa en sangre. Solamente el 1,8-cineol fue el único terpeno que no tuvo efecto sobre el índice de Lee y de adiposidad, a diferencia del limoneno,  $\alpha$ -terpineol, así como la mezcla terpénica.

**Palabras clave:** Compuestos naturales, radicales libres, antioxidantes

## ABSTRACT

High-fat diets (HFD) lead to the development of pathologies related to poor nutrition such as obesity and cardiovascular diseases. *Callistemon citrinus* is a plant to which various biological activities have been attributed, in a hypercaloric diet model in rats plus daily oral administration with the leaf extract at a concentration of 250 mg/kg showed a decrease in weight in individuals. A high content of terpenes (1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, and limonene) has been determined in the composition of this extract. In this study, the effect of terpenes on serum values and morphometric parameters (Lee index and adiposity) in rats fed a high-fat diet was determined. 6 groups of rats were used with n=6 for each group, the group I was the control, group II was the DAG (63% Purina® Rodent Chow feed, 41.66% fat and 16.66% sucrose). Groups III, IV, V, VI were fed with the DAG plus the daily oral administration of the terpenes (1-8cineol at 0.88 mg/kg, limonene at 0.43 mg/kg,  $\alpha$ -terpineol at 0.32 mg/kg, and the terpene mix of all). The results obtained showed that the high fat diet given to the animals did not contribute to increasing cholesterol levels and weight. However, other parameters were modified. The main terpenes of *C. citrinus* decreased food intake, triacylglyceride levels, and blood glucose. 1,8-Cineol was the only terpene that had no effect on the Lee index and adiposity, unlike limonene,  $\alpha$ -terpineol, and the terpene mixture.

**Keywords:** Natural compounds, free radicals, antioxidants

## INTRODUCCIÓN

El índice Lee es un parámetro morfométrico que se ha usado en ratas con el fin de conocer la relación que existe entre el peso y la longitud, que se usa con el fin de indicar obesidad en ratas (Simson y Gold, 1982). Por otro lado, existen otros índices orientados a la cantidad de tejido adiposo abdominal que poseen las ratas como el índice de adiposidad. Esta medida proporciona una estimación de la cantidad de grasa abdominal total de la rata respecto al peso mismo, lo cual abre un panorama amplio al momento de saber el estado de salud de los animales (Novelli *et al.*, 2007).

La alimentación excesiva por las DAG conlleva a un aumento de ácidos grasos, los cuales pueden causar hipertrigliceridemia a la que se le ha reportado con patologías como obesidad y resistencia a la insulina, por lo que los niveles de la concentración plasmática de triacilglicéridos y glucosa son indicadores de las patologías ya mencionadas (Unger *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha determinado que la correlación entre los valores de triacilglicéridos, glucosa y colesterol, son determinantes para tomarse en cuenta en diagnóstico para patologías como resistencia a la insulina, obesidad y diabetes en humanos (Hernández-Vite *et al.*, 2015). El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de los terpenos mayoritarios (1,8-cineol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol) de *C. citrinus* sobre los parámetros morfométricos y valores de glucosa, colesterol y triacilglicéridos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, mantenidas en condiciones ambientales controladas (12 horas de luz/12 horas oscuridad, humedad relativa ente 60-70 %, Temperatura de 20°C, con libre acceso a comida y agua). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El control de los animales y el

proceso experimental se llevaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999).

### Modelo experimental

Se utilizó el modelo experimental de Ortega-Perez et al., (2020) con algunas modificaciones. Se usaron 36 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), divididas en 6 grupos con una n=6 para cada grupo, con un peso inicial de 200-250 gramos y se usaron a las 8 semanas desde su gestación. La duración del modelo experimental fue de 15 semanas y los grupos experimentales fueron conformados de acuerdo con el cuadro 2.

**Cuadro 2. Modelo experimental**

Nombre del grupo	Tipo de alimentación	Nombre y concentración del compuesto
Grupo control	Rodent Chow Purina® y agua <i>ad libitum</i> .	Sin administración de ningún compuesto
Grupo DAG (dieta alta en grasas)	63% del alimento Rodent Chow Purina®, 20.84% de grasa vegetal, 20.84% manteca de cerdo, 16.66% de sacarosa y agua <i>ad libitum</i> .	Sin administración de ningún compuesto
Grupo 1,8-cineol	Dieta alta en grasas y agua <i>ad libitum</i> .	1,8-cineol a 0.88 mg/kg de peso por vía oral diariamente.
Grupo $\alpha$ -terpineol	Dieta alta en grasas y agua <i>ad libitum</i> .	$\alpha$ -terpineol a 0.32 mg/kg de peso por vía oral diariamente.
Grupo limoneno	Dieta alta en grasas y agua <i>ad libitum</i> .	Limoneno a 0.43 mg/kg de peso por vía oral diariamente.
Grupo mezcla	Dieta alta en grasas y agua <i>ab libitum</i> .	Mezcla terpénica (0.43 mg/kg de limoneno, 0.32 mg/kg de $\alpha$ -terpineol y 0.88 mg/kg de 1,8-cineol) por vía oral diariamente.

En cada uno de los grupos, diariamente se pesó y midió el consumo del alimento y agua, mientras que el peso de los animales fue semanalmente.

## **Determinación de los valores de glucosa, triacilglicéridos y colesterol**

Al término del experimento, se determinaron los niveles de triacilglicéridos y glucosa con un monitor sanguíneo Accutrend Plus® utilizando tiras de la misma marca, mientras que para el colesterol total se usaron kits comerciales de métodos enzimáticos colorimétricos SPINREACT®.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

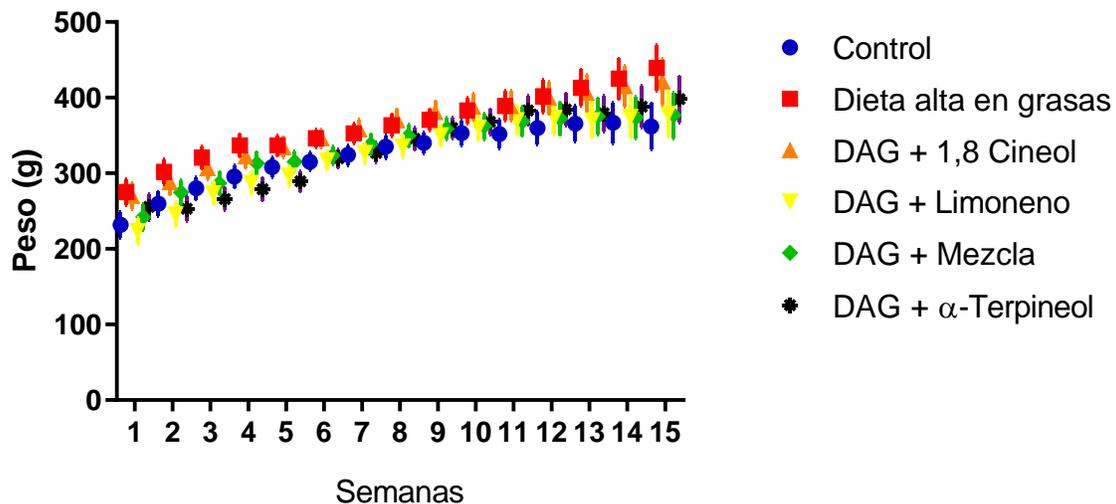
### **PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS**

#### **Peso corporal**

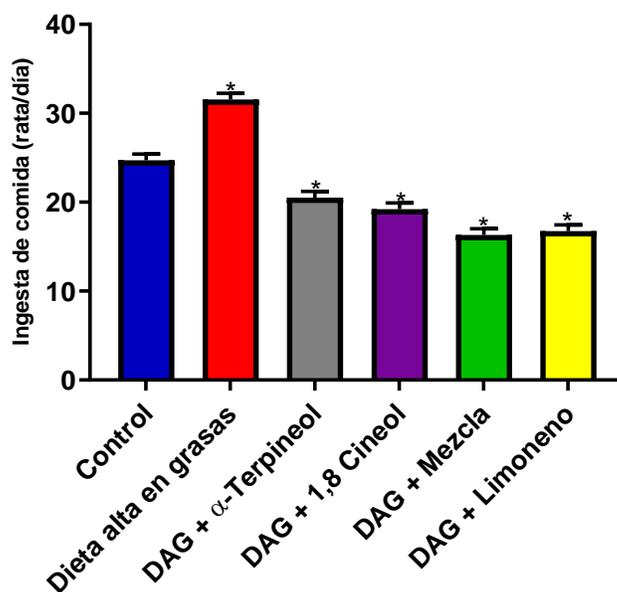
Durante las 15 semanas se llevó un registro semanal del peso de los animales con el objetivo de observar la ganancia de peso obtenida en los animales de estudio. En la **figura 2** referente a las medias de los tratamientos respecto a la ganancia de peso no se mostraron diferencias significativas, por lo que la dieta alta en grasas no aumentó el peso de los individuos. En la **figura 3** se cuantificó la cantidad de alimento a lo largo del experimento, se observaron diferencias significativas en todos los grupos respecto al grupo control, la DAG aumentó el consumo de alimento, mientras los terpenos disminuyeron la ingesta de alimento.

Debido a lo anterior, se sugiere que los terpenos ayudaron a disminuir el apetito en los animales. En otro estudio realizado durante 10 semanas con una dieta alta en grasas (40%), se determinó que no hubo cambios significativos en el peso de los individuos, pero si en la ingesta de alimento (Harris y Kor, 1992). Aunque, en otro modelo de dieta alta en grasas (22.5%) que tuvo una duración de 20 semanas, no se observaron diferencias respecto al grupo control, aun agregando sacarosa al 25% en el agua con la dieta antes mencionada y no se mostraron cambios en el peso de los animales (Moreno-Fernández *et al.*, 2018).

Por lo tanto, las dietas altas en grasas no han mostrado tener un cambio en el peso de los individuos, pero no significa que no repercutan en la salud de los individuos, por lo que se deben de tomar otros parámetros y variables para determinar un análisis robusto. Sin embargo, en otros estudios se han observado que existen variables que afectan el peso de los individuos como variaciones genéticas o cambios conductuales (Buettner *et al.*, 2006). En otros trabajos usando  $\alpha$ -terpineol a una concentración de 25, 50 y 100 mg/kg de peso, en un modelo de dieta alta en grasas (35%), se determinó la correlación con una baja ingesta de alimento y hacen énfasis en que posiblemente de deba a una modulación del apetito en regiones como el hipotálamo a través del eje del intestino-cerebro (de Sousa *et al.*, 2020), por lo antes mencionado en el presente estudio se propone que los terpenos estén actuando de la misma manera.



**Figura 2.** Peso corporal durante 15 semanas de las ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos). No hay diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA de dos vías, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).



**Figura 3.** Ingesta de comida de las ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA de dos vías, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ).

### Índice Lee y de adiposidad

En el **cuadro 3**, se muestra el índice de Lee y el de adiposidad de los animales respecto al modelo de inducción de dieta alta en grasas implementado en el presente estudio. En el índice de Lee no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. En el índice de adiposidad existen diferencias significativas entre las medias de los grupos DAG, control y limoneno lo cual indica que en el grupo DAG existe un alto porcentaje de tejido adiposo respecto a los grupos control y limoneno, por lo que el limoneno está ayudando a tener una reducción del tejido adiposo reflejado en el peso. No obstante, esto se relaciona con otro trabajo en el cual se utilizó D-limoneno a una concentración de 5000 mg/kg en un modelo de dieta hipercalórica y se encontró que el D-limoneno ayuda a reducir el tamaño de los adipocitos blancos y cafés (Jing et al., 2013), por lo que el limoneno puede estar disminuyendo la cantidad de tejido adiposo de

los animales. Por otro lado, se ha reportado que el índice de Lee es una medida que puede dar una estimación sobre la relación del peso y la longitud del individuo, no obstante, es necesario tener otros marcadores e índices para tener certeza sobre el estatus de salud en los individuos, ya que existen variables genéticas y metabólicas que juegan un papel importante (Stephens *et al.*, 1980; Buettner *et al.*, 2006).

**Cuadro 3.** Índice de Lee y adiposidad en ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ).

	Control	DAG	1,8-Cineol	$\alpha$ -Terpineol	Limoneno	Mezcla
Índice de Lee	33.56 $\pm$ 2.02	35.03 $\pm$ 1.30	33.56 $\pm$ 1.94	31.14 $\pm$ 1.66	30.36 $\pm$ 1.84	32.35 $\pm$ 0.86
Índice de adiposidad	3.76 $\pm$ 0.36	<b>10.18<math>\pm</math>0.68*</b>	<b>9.97<math>\pm</math>2.87*</b>	7.15 $\pm$ 1.06	5.95 $\pm$ 1.16	6.88 $\pm$ 1.33

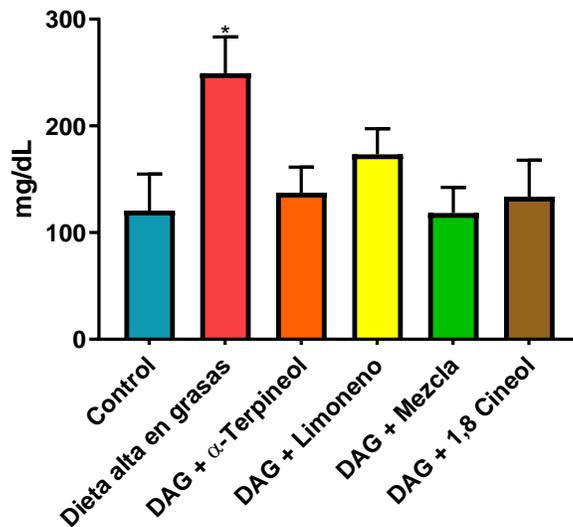
### Determinación de los niveles de glucosa, triacilglicéridos y colesterol

En la **figura 4** se presenta la concentración plasmática de triacilglicéridos en sangre, en la cual existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Los niveles de triacilglicéridos del grupo DAG está aumentado respecto al grupo control, mientras que los grupos tratados con 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica, se comportan similarmente al grupo control. Esto sugiere que el 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica son responsables de que ocurra una disminución de los triacilglicéridos en sangre. Los valores de los niveles de glucosa se muestran en la **figura 5**, en la que se observan cambios entre las medias de los tratamientos. Existen diferencias entre las medias de los grupos DAG y control, lo que confirma que los niveles de glucosa aumentaron por el consumo de la DAG. Los grupos de ratas tratados con 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica se comportan similar al grupo control, sugiriendo que estos tienen un efecto sobre la disminución de los niveles de glucosa en sangre. En la **figura 6** se observan los resultados de la concentración plasmática de colesterol en sangre, en la cual no existen diferencias significativas

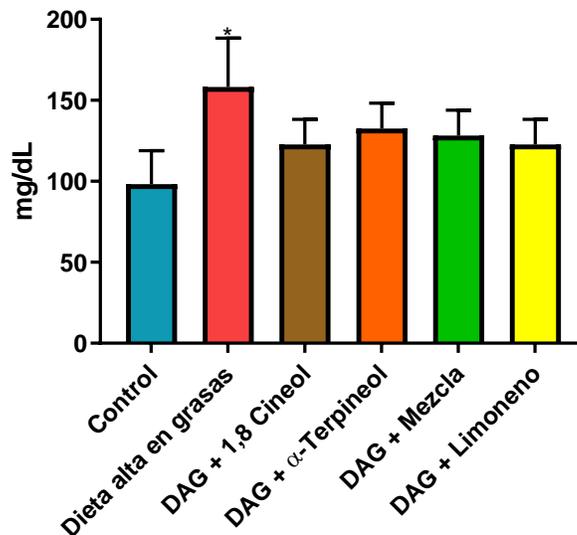
entre las medias de los tratamientos, ya que los niveles de colesterol no se incrementaron durante la alimentación de la DAG.

de Sousa *et al.* (2020) reportaron que al administrar  $\alpha$ -terpineol a una concentración de 25, 50 y 100 mg/kg de peso en un modelo de dieta alta en grasas (35%) durante 12 semanas, este produjo un efecto en la disminución de los niveles de triacilglicéridos y colesterol por lo que los terpenos mayoritarios de *C. citrinus*, podrían estar actuando de la misma manera. Sin embargo, la dieta no contenía colesterol por lo que no se observaron cambios en los niveles para cada uno de los grupos experimentales. En otro trabajo en el cual se usó un modelo de DAG (39%) durante un periodo de 8, 16 y 24 semanas, se determinó un aumento de los triacilglicéridos en sangre (Liu *et al.*, 2016).

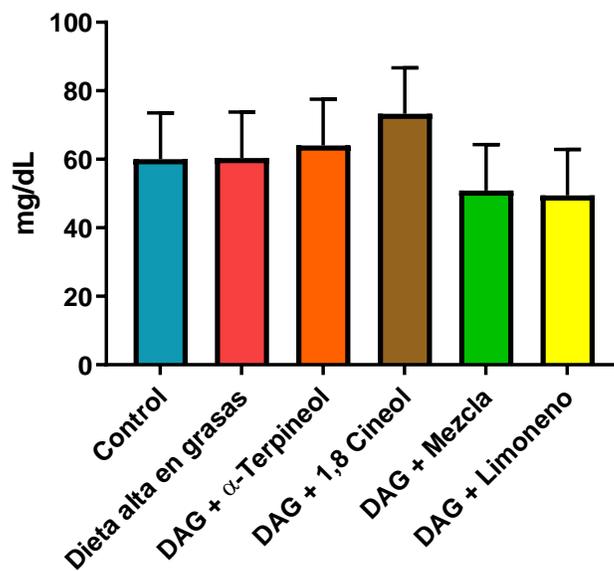
Respecto a los niveles de glucosa, en diversas investigaciones se demuestra que con una alimentación diaria con una DAG (16%), ocurre un aumento en los niveles de glucosa en sangre en ratas (Chen *et al.*, 2010). Como lo reportado por Xu *et al.* (2016), quienes observaron niveles altos de glucosa durante la alimentación con una DAG (10%) en ratones durante 4 semanas. Los niveles de glucosa también se han reportado aumentados en modelos de DAG (60%) en ratones, con una duración de 8 semanas. Debido a los trabajos anteriores, la DAG aumenta los niveles de glucosa de manera similar. Sin embargo, los terpenos de *C. citrinus* revierten el aumento de glucosa generado por la dieta. Dentro de los terpenos que se usaron en este trabajo, se ha reportado que el limoneno tiene una actividad antihiper glucémica, inhibiendo ciertas enzimas del metabolismo de azúcares (Murali y Saravanan 2012), los resultados obtenidos de este estudio sugieren que el 1,8-cineol y el  $\alpha$ -terpinol podrían estar regulando los niveles de glucosa en la sangre.



**Figura 4.** Concentración plasmática de triacilglicéridos en sangre de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA de dos vías, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).



**Figura 5.** Concentración plasmática de glucosa en sangre de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA de dos vías, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).



**Figura 6.** Concentración plasmática de colesterol en sangre ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA de dos vías, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).

## CONCLUSIÓN

El 1-8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica reducen los niveles de triacilglicéridos y glucosa en sangre bajo una DAG; sin embargo, la DAG no mostró tener un aumento en los niveles de colesterol.

## REFERENCIAS

- Butturini, E., Cavalieri, E., de Prati, A. C., Darra, E., Rigo, A., Shoji, K., ... & Mariotto, S. (2011). Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One*, 6(5), e20174.
- Chen, H., Liu, L. J., Zhu, J. J., Xu, B., & Li, R. (2010). Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chemistry*, 119(4), 1633-1636.
- Folmer, V., Soares, J. C., Gabriel, D., & Rocha, J. B. (2003). A high fat diet inhibits  $\delta$ -aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *The Journal of nutrition*, 133(7), 2165-2170.

- Hernández-Vite, Y., Elizalde-Barrera, C. I., Flores-Alcántar, M. G., Vargas-Ayala, G., & Loreto-Bernal, M. L. (2015). Asociación entre el índice triglicéridos/colesterol HDL y la glucosa alterada en ayuno en pacientes normotensos con obesidad y sobrepeso. *Medicina Interna de México*, 31(5), 507-515.
- Kaneda, H., Taguchi, J., Ogasawara, K., Aizawa, T., & Ohno, M. (2002). Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 162(1), 221-225.
- Liu, J., Han, L., Zhu, L., & Yu, Y. (2016). Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats. *Lipids in health and disease*, 15(1), 1-9.
- Mert, H., Comba, B., Mert, N., Çınar, D. A., & Apaydın Yıldırım, B. (2016). Advanced oxidation protein products (AOPP) levels and kidney function in fluorotic sheep. *Fluoride*, 49(3 Pt 2), 336-42.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- Murali, R., Saravanan, R. (2012). Antidiabetic effect of D-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2,269-275.
- Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K. Y., Chung, H. Y., & Lee, J. (2010). A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters*, 482(3), 235-239.
- Piowar, A., Knapik-Kordecka, M., & Warwas, M. (2007). AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 77(2), 188-192.
- Rozenberg, O., Rosenblat, M., Coleman, R., Shih, D. M., & Aviram, M. (2003). Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 774-784.
- Unger, G., Benozzi, S. F., Perruzza, F., & Pennacchiotti, G. L. (2014). Índice triglicéridos y glucosa: un indicador útil de insulinoresistencia. *Endocrinología y Nutrición*, 61(10), 533-540.
- Xu, P., Ying, L., Hong, G., & Wang, Y. (2016). The effects of the aqueous extract and residue of Matcha on the antioxidant status and lipid and glucose levels in mice fed a high-fat diet. *Food & function*, 7(1), 294-300.

## 7.2 CAPÍTULO II. Efecto de los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas

### RESUMEN

*Callistemon citrinus* es una planta perteneciente a la familia Myrtaceae, a la cual se le han atribuido diversas actividades biológicas. En este estudio se investigó el efecto de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* (1,8-cineol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol) sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en un modelo de dieta alta en grasas durante 15 semanas. Altos niveles de los biomarcadores del estrés oxidativo: Malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) y los productos avanzados de la oxidación de las proteínas (AOPP) se encontraron en el grupo de la dieta rica en grasa en comparación a grupo control. Mientras que los niveles de los biomarcadores en los grupos con el 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno más la dieta rica en grasa, presentaron una disminución de estos parámetros a valores semejantes al grupo control. Sin embargo, la actividad de la paraoxonasa (PON1) solo estuvo incrementada en los grupos con el  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica más la dieta rica en grasa. No obstante, los niveles de glutatión reducido (GSH) se vieron disminuidos en todos los grupos, en comparación al grupo control. Cabe destacar que el grupo con la mezcla de los terpenos más la dieta rica en grasa tuvo un comportamiento distinto, ya que la actividad de la PON1 no cambió y los niveles de los productos de la lipoperoxidación se incrementaron a valores semejantes al grupo con la dieta rica en grasa. Mientras que los niveles de AOPP y GSH disminuyeron ligeramente a diferencia de los grupos con la dieta rica en grasa. Con estos resultados se concluye que el 1,8-cineol, limoneno y el  $\alpha$ -terpineol mostraron tener un efecto antioxidante ya que redujeron los niveles de los productos de la lipoperoxidación, así como los AOPP.

**Palabras clave:** Biomarcadores, terpenos, *Callistemon citrinus*

## ABSTRACT

*Callistemon citrinus* is a plant belonging to the Myrtaceae family, to which various biological activities have been attributed. In this study, the effect of the major terpenes of *C. citrinus* (1-8-cineol, limonene and  $\alpha$ -terpineol) on oxidative stress biomarkers in a fed high-fat diet animal model for 15 weeks was investigated.

High levels of the oxidative stress biomarkers: malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and advanced oxidation protein products (AOPP) were observed in the HFD treated group when compared to control group. While the levels of the three biomarkers in the 1,8-cineol did not change during all HFD treatment. However, the MAD and HNE levels in the  $\alpha$ -terpineol and limonene plus HFD groups did not changes. Instead, the AOPP levels in each group was decreased to values similar to the control group. Paraoxanase (PON1) activity was increased only in the  $\alpha$ -terpineol and the terpenic mixture groups. Meanwhile, reduced glutathione (GSH) levels showed a decreased in all the groups compare to the control group. It should be noted that the group with the terpenic mixture plus HFD had a different behavior since the PON1 activity did not changes and the values of the lipiperoxidation products increased to similar values to the HFD group, while AOPP and GSH levels decreased slightly unlike the groups with the HFD. In conclusion, 1-8-cineol, limonene and  $\alpha$ -terpineol possesses the capability of attenuate the oxidative stress in a HFD.

**Keywords:** Biomarkers, terpenes, *Callistemon citrinus*

## INTRODUCCIÓN

Los biomarcadores de estrés oxidativo dan un panorama del daño causado a las principales biomoléculas como ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos. En las dietas altas en grasas se ha reportado que existe un aumento de estrés oxidativo por lo que usar biomarcadores en modelos animales da una idea del estatus oxidativo de estos, algunos de estos biomarcadores son MDA, HNE, GSH, AOPP, PON1, etc.

En la lipoperoxidación existen compuestos que actúan como indicadores de daño como el malondialdehído (MDA), lípidos hidroperóxidos, dienos conjugados, 4-hidroxinonenal (HNE) y los F2-isoprostanos (8-epiPGF2a). Los hidroperóxidos son generados en las primeras etapas de la peroxidación lípidos, mientras que el MDA o F2-isoprostanos se forman al final de una larga fase oxidativa (Halliwell y Whiteman, 2004). La principal fuente de MDA en muestras biológicas es la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados con dos o más dobles enlaces, es por esto que la lipoperoxidación en lípidos es un proceso autocatalítico y de propagación (Del Rio y Pellegrini, 2005).

El GSH es un antioxidante endógeno importante en los hepatocitos, este tiene un potencial redox normal GSH / GSSG mantiene las funciones de muchas proteínas y enzimas celulares, incluidas muchas de las que participan en la muerte celular y las cascadas de supervivencia. En muchas formas de enfermedades hepáticas, la reserva de GSH hepático se ve comprometida por el deterioro de la síntesis y el transporte y/o el consumo excesivo. La alteración de la homeostasis del GSH en el hígado no solo da lugar a las especies reactivas de oxígeno que oxidan las proteínas, ADN y lípidos, pero también altera múltiples vías de señalización que afectan el metabolismo intermedio, la supervivencia y la proliferación y por tanto contribuye a la patogenia de diversas enfermedades hepáticas (Yuan y Kaplowitz, 2009).

Los productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP) fueron descubiertos por primera vez en pacientes con insuficiencia renal crónica, desde entonces se ha determinado que los AOPP pueden desempeñar un papel como biomarcador en

condiciones patológicas de muchas enfermedades involucradas con un aumento excesivo de las especies reactivas de oxígeno como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, etc. (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Kalousová *et al.*, 2004).

La paraoxonasa (PON1) es un enzima antioxidante estrechamente asociado con las lipoproteínas de alta densidad. Es una esterasa calcio-dependiente, que desintoxica los peróxidos de lípidos y se distribuye en muchos tejidos incluidos el hígado, el cerebro, los pulmones, el corazón, los riñones y el intestino delgado (Sentí *et al.*, 2003). En el presente capítulo se evaluaron los niveles de los principales biomarcadores de estrés oxidativo en un modelo de dieta alta en grasas con la administración oral diaria de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus*, durante 15 semanas. El objetivo del presente capítulo fue determinar el efecto de los terpenos mayoritarios (1-8-cineol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol) de *C. citrinus* sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, mantenidas en condiciones ambientales controladas (12 horas de luz/12 horas oscuridad, humedad relativa ente 60-70 %, Temperatura de 20°C, con libre acceso a comida y agua). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El control de los animales y el proceso experimental se llevaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999).

### **Modelo experimental**

Se utilizó el modelo experimental de Ortega-Perez *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. Se usaron 36 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), divididas en 6 grupos con una n=6 para cada grupo, con un peso inicial de 200-250 gramos y se usaron a las 8

semanas desde su gestación. La duración del modelo experimental fue de 15 semanas y los grupos experimentales fueron conformados de acuerdo con el **cuadro 2**. En cada uno de los grupos, diariamente se pesó y midió el consumo del alimento y agua, mientras que el peso de los animales fue semanalmente.

### **Preparación de los homogenados de hígado y determinación de proteínas totales**

El hígado se homogenizó en un mortero usando 2 ml de buffer salino de fosfatos a 50 mM pH 7.4. Al término de esto, los homogenados fueron centrifugados a 10,000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le cuantificó el contenido de proteínas totales mediante la técnica de Bradford, en la cual se usó 1 µL de homogenado de hígado, después se le añade 799 µL de agua destilada, se mezcló y se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se midió a una longitud de onda 595 nm.

### **Determinación de la PON1**

Se agregó 100 µl de homogenado diluido (1:5) a tubos eppendorff y se añadió 1900µl del sustrato (1.2 mmol/L paraoxon (O, O-dietil-O-p-nitrofenil fosfato) en 0.26 mmol/L Tris-HCL, pH 8.5, 25 mmol/L CaCl<sub>2</sub> y 0.5 mol/L NaCl. Se mezcló e inmediatamente se registró la lectura a 405 nm para establecer el tiempo cero, y después se realizaron lecturas cada 30s minutos durante 3 min (Kudchodkar *et al.*, 2000).

### **Determinación de MDA y HNE**

Para la determinación del malodialdehído (MDA) en un tubo eppendorff, se colocó 0.65 ml de 1-metil-2-fenilindol y 0.2 ml de la muestra o del estándar, 100 µM tetraetoxipropanol se le añadió 0.15 ml de HCl 37%, se mezcló y se puso a incubar a 45°C durante 60 minutos. Después se enfriaron las muestras durante 5 min, una vez frías se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente se registró la lectura a una longitud de onda de 586 nm. Para la determinación del 4-hidroxinonenal (HNE) + (MDA) se realizó

de igual manera a lo anteriormente descrito, excepto que el HCl es remplazado por ácido metasulfónico (15.4 M) (Johnston *et al.*, 2007).

### **Determinación de glutatión reducido**

Mediante la técnica de Sedlak y Lindsay (1968) se determinó el contenido de glutatión reducido (GSH) de la siguiente forma: en tubos de ensayo se agregó 20 µL de homogenado de tejido, 480 µL Tris buffer (0.2 M, pH 8.2) y 25 µL de cloruro de nitrotetrazolio azul (DNTB) (0.01 M), se mezcló y posteriormente se adicionó 1975 µL de metanol absoluto. El blanco se preparó únicamente sin la muestra. Los tubos de ensayo se taparon con papel parafilm y se incubaron con agitación de un mezclador de laboratorio (shaker) durante 5 minutos, después se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, la absorbancia se registró a una longitud de onda de 412 nm.

### **Determinación de los productos avanzados de la oxidación de las proteínas (AOPP)**

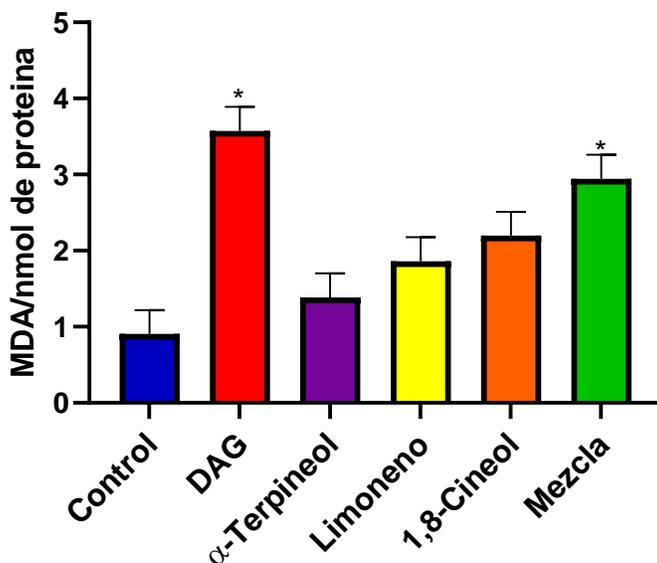
Para la determinación de las AOPP se usó el protocolo de Hanasand M. (2012) el cual consistió en agregar a un tubo eppendorff 1ml de buffer de fosfatos (20mM, pH 7.4), 50 µL de homogenado, 50 µL de yoduro de potasio (1.16M) y 100 µL de ácido acético. Después se centrifugaron las muestras a 5800g por 5 minutos y se dejaron incubar durante dos minutos. Finalmente, la absorbancia se registró una longitud de onda de 340 nm.

## **RESULTADOS**

### **Concentración en los niveles de MDA**

La concentración de los niveles de MDA en los diferentes grupos experimentales se muestra en la fig. 7. En esta se observan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, el grupo DAG y el de la mezcla terpénica alcanzaron niveles altos de

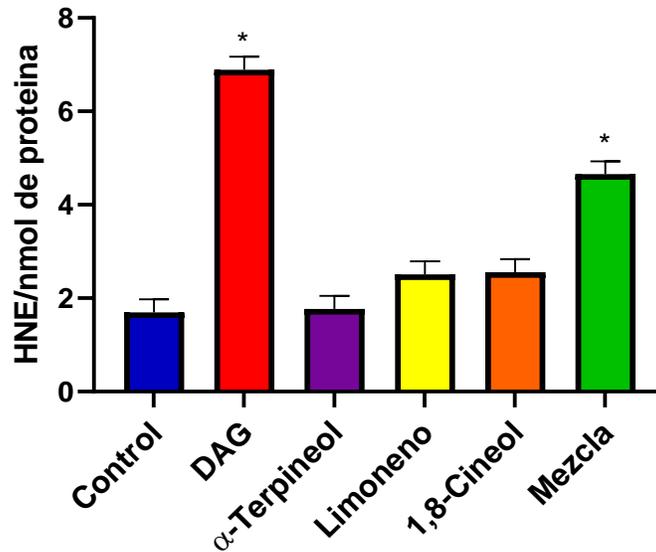
MDA, mientras que el grupo 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno se comportaron de manera similar al grupo control.



**Figura 7.** Niveles de MDA en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

### Concentración de los niveles de HNE

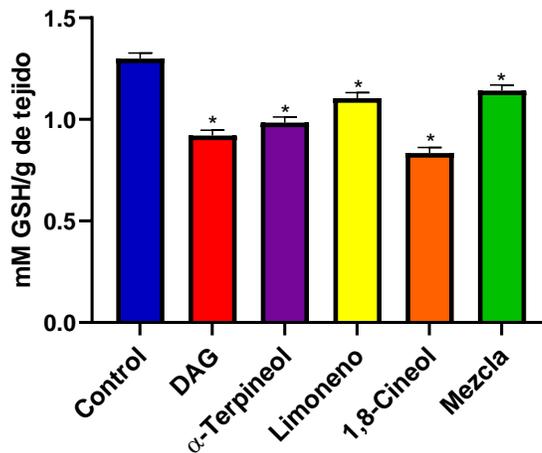
La concentración de los niveles de HNE en los diferentes grupos experimentales se presenta en la **figura 8**. En esta se observan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, el grupo DAG (Dieta alta en grasas) y el de la mezcla terpénica alcanzaron niveles altos de HNE, mientras que el grupo 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno se comportaron de manera similar al grupo control.



**Figura 8.** Niveles de HNE en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

### Niveles de glutatión reducido (GSH)

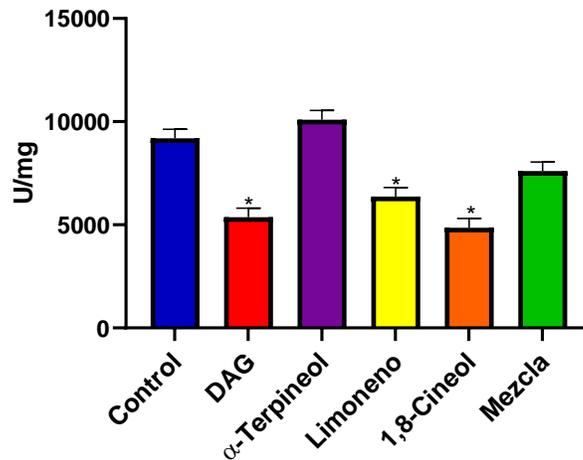
Los niveles de GSH en los grupos experimentales se muestran en la **figura 9**. Los resultados indican diferencias significativas entre las medias de los tratamientos DAG, mezcla terpénica, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno. Estos se comportan diferente al grupo control, todos los grupos experimentales a excepción del grupo control muestran niveles reducidos de GSH.



**Figura 9.** Niveles de GSH en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

### Niveles de la enzima paraoxanasa 1 (PON1)

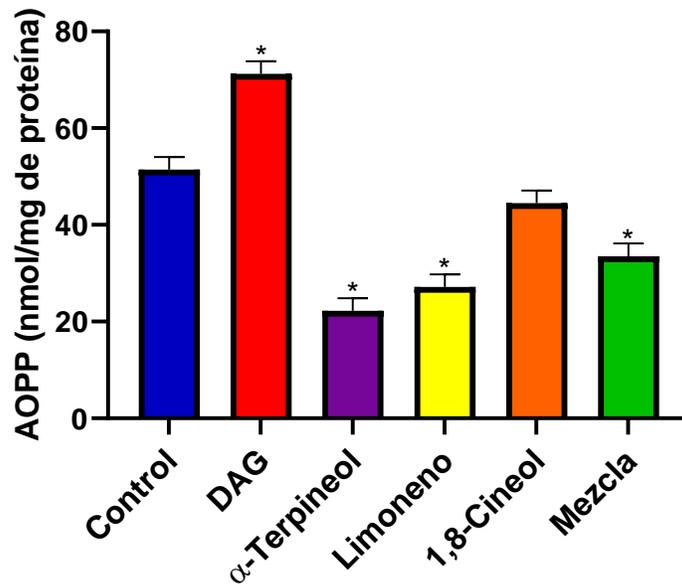
Los niveles de PON1 en los diferentes grupos experimentales se muestran en la **figura 10**. En esta se observan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos DAG, 1,8-cineol, y limoneno. Estos se comportan diferentes al grupo control por lo que presentan niveles bajos de la enzima PON1. Sin embargo, el grupo  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica tienen niveles de esta enzima similares al control.



**Figura 10.** Niveles de PON1 en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

### Productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP)

En la **figura 11** se presentan los niveles de los AOPP en los grupos experimentales. Se observan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos DAG y control, en la DAG hay mayores niveles de AOPP. Sin embargo, el 1,8-cineol se comporta similar al grupo control, mientras que los grupos con la mezcla terpénica,  $\alpha$ -terpeneol y limoneno tienen niveles aún más bajos que el grupo control.



**Figura 11.** Niveles de AOPP en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

## DISCUSIÓN

La DAG incrementó los niveles de lipoperoxidación de lípidos, ya que los niveles de MDA y HNE se vieron incrementados en este grupo, no obstante, los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* (1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno) disminuyeron los niveles de lipoperoxidación. Respecto al grupo de la mezcla terpénica, se observan niveles elevados de MDA y HNE, esto puede deberse a una inhibición generada al combinar los terpenos. En otros modelos de dieta alta en grasas (45 % grasas) durante 6 semanas, se reportaron niveles de MDA y HNE altos respecto al grupo control en el hipocampo de ratas (Park *et al.*, 2010).

En otro estudio donde se usó una dieta alta en grasas (50 % grasas) durante dos meses, encontraron los niveles de MDA aumentados en el hígado de ratas respecto a su grupo estándar (Folmer *et al.*, 2003), siendo similar al efecto de la DAG. Por otro lado, se han hecho estudios con aceites esenciales con *Thymus zygis* en los que se ha reportado tener compuestos mayoritarios (carvacrol, timol, p-cimeno y  $\gamma$ -terpineno) que ayudan a

disminuir los niveles de MDA (Miguel *et al.*, 2010), además se han hecho estudios con aceite esencial de apio que contiene 74.6 % de limoneno y en el cual se determinó una alta actividad inhibitoria hacia el malonaldehído (MDA) (Wei, 2007). Por lo que se sugiere que los terpenos tienen una participación importante contrarrestando el estrés oxidativo generado en la lipoperoxidación.

Los niveles bajos de GSH han demostrado ser biomarcadores de estrés oxidativo, por lo que con la DAG se producen radicales libres y las especies reactivas de oxígeno en los diferentes tratamientos. En el caso de los terpenos se han hecho estudios con los sesquiterpenos costunólido y lactona-dehidrocostus, reportándose en un estudio hecho con células THP-1 que estos redujeron los niveles de GSH intracelular significativamente, sin afectar el equilibrio redox que existe entre el glutatión oxidado (Butturini *et al.*, 2011). Debido a lo anterior los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* se comportan de manera similar. Otro de los biomarcadores de estrés oxidativo es la PON1, los niveles de bajos de esta enzima actúan como marcador de daño hepático. En los grupos DAG, 1,8-cineol y limoneno se observan bajos niveles de PON1, mientras que en el grupo de la mezcla terpénica se observa un incremento en los niveles de esta, debido a que tuvo un efecto protector que evitó la oxidación de las LDL, HDL y VLDL. Se ha reportado que al oxidarse estas, se activan receptores como CD36 y SR-A que activan a los macrófagos formando células espumosas (Rozenberg *et al.*, 2003).

Los AOPP se han visto involucrados como biomarcadores en diversas patologías como arterosclerosis, insuficiencia renal, diabetes tipo II, entre otras. En el grupo DAG se observa un aumento en los niveles de AOPP respecto al grupo control, mientras que en los terpenos y la mezcla se reducen los niveles de estos y por lo tanto, los resultados sugieren que estos compuestos evitan la oxidación de proteínas (Kaneda *et al.*, 2002; Piwowar *et al.*, 2007; Mert *et al.*, 2016).

## **CONCLUSIÓN**

Los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* (1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno) mostraron tener un efecto antioxidante regulando los niveles de los biomarcadores de

estrés oxidativo (MDA, HNE, AOPP), sin embargo, el  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica solo aumentaron los niveles de la PON1. Además, los niveles GSH se vieron disminuidos con todos los terpenos.

## REFERENCIAS

- Akkol, E. K., Avcı, G., Küçükkurt, I., Keleş, H., Tamer, U., Ince, S., & Yesilada, E. (2009). Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. *Journal of ethnopharmacology*, 126(2), 314-319.
- Aladaileh, S. H., Saghir, S. A., Murugesu, K., Sadikun, A., Ahmad, A., Kaur, G., ... & Murugaiyah, V. (2019). Antihyperlipidemic and antioxidant effects of *averrhoa carambola* extract in high-fat diet-fed rats. *Biomedicines*, 7(3), 72.
- Aviram, M., M. Rosenblat, S. Billecke, J. Erogul, R. Sorenson, C. L. Bisgaier, R. S. Newton, y B. La Du. 1999. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 892–904.
- Azerad, R. (2014). 1, 8-Cineole: chemical and biological oxidation reactions and products. *Chempluschem*, 79(5), 634.
- Beltowski, J., Wojcicka, G., Gorny, D., & Marciniak, A. (2000). The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(4), 2).
- Bhowal, M., & Gopal, M. (2015). Eucalyptol: Safety and pharmacological profile. *J. Pharm. Sci*, 5, 125-131.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Browne, R. W., & Armstrong, D. (1998). Reduced glutathione and glutathione disulfide. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 347-352). Humana Press.
- Butturini, E., Cavalieri, E., de Prati, A. C., Darra, E., Rigo, A., Shoji, K., ... & Mariotto, S. (2011). Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One*, 6(5), e20174.
- de Oliveira, M. G., Marques, R. B., de Santana, M. F., Santos, A. B., Brito, F. A., Barreto, E. O., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2012).  $\alpha$ -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 111(2), 120-125.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4), 316-328.
- Diniz, Y. S. A., Cicogna, A. C., Padovani, C. R., Santana, L. S., Faine, L. A., & Novelli, E. L. (2004). Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition*, 20(2), 230-234.
- Folmer, V., Soares, J. C., Gabriel, D., & Rocha, J. B. (2003). A high fat diet inhibits  $\delta$ -aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *The Journal of nutrition*, 133(7), 2165-2170.

- Gewirtz, A.T., Collier-Hyams, L.S., Young, A.N., Kucharzik, T., Guilford, W.J., Parkinson, J.F., Williams, I.R., Neish, A.S., Madara, J.L., 2002. Lipoxin A4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Immunol.* 168, 5260–5267.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Gøransson, L. G., Brede, C., & Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica chimica acta*, 413(9-10), 901-906.
- Johnston, J.W., Horne, S., Harding, K., Benson, E.E. 2007. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: Malodialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45,108-112.
- Kalousová, M., Fialová, L., Skrha, J., Zima, T., Soukupová, J., Malbohan, I. M., & Stipek, S. (2004). Oxidative stress, inflammation and autoimmune reaction in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep*, 105(1), 21-28.
- Kaneda, H., Taguchi, J., Ogasawara, K., Aizawa, T., & Ohno, M. (2002). Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 162(1), 221-225.
- Kesh, S. B., Sarkar, D. E. B. A. S. H. R. E. E., & Manna, K. R. I. S. H. N. E. N. D. U. (2016). High-fat diet-induced oxidative stress and its impact on metabolic syndrome: a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 9(1), 47-52.
- Klesges, R. C., Klesges, L. M., Haddock, C. K., & Eck, L. H. (1992). A longitudinal analysis of the impact of dietary intake and physical activity on weight change in adults. *The American journal of clinical nutrition*, 55(4), 818-822.
- Kudchodkar, B.J., Lacko, A.G., Dory, L., Fungwe, T.V. 2000. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *The Journal of Nutrition Journal*. 2427-2433
- La Du, B. N. 1996. Structural and functional diversity of paraoxonase. *Nat. Med.* 2: 1186–1187.
- Liu, H., Han, T., Tian, J., Zhu, Z. Y., Liu, Y., Li, Y., ... & Feng, Y. Y. (2012). Monitoring oxidative stress in acute-on-chronic liver failure by advanced oxidation protein products. *Hepatology Research*, 42(2), 171-180.
- López-Mejía, A., Ortega-Pérez, L. G., Godínez-Hernández, D., Nateras-Marin, B., Meléndez-Herrera, E., Rios-Chavez, P. 2019. Chemopreventive effect of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels against colon cancer induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rats. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 145(6): 1417-1426.
- Mackness, M. I., B. Mackness, P. N. Durrington, P. W. Connelly, y R. A. Hegele. 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 7: 69–76.
- Mehta, R. S., Gunnnett, C. A., Harris, S. R., Bunce, O. R., & Hartle, D. K. (1994). High fish oil diet increases oxidative stress potential in mammary gland of spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 21(11), 881-889.

- Mert, H., Comba, B., Mert, N., Çınar, D. A., & Apaydın Yıldırım, B. (2016). Advanced oxidation protein products (AOPP) levels and kidney function in fluorotic sheep. *Fluoride*, 49(3 Pt 2), 336-42.
- Nguyen, S. D., y Sok, D. E. 2003. Oxidative inactivation of paraoxonase1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free radical research*. 37(12): 1319-1330.
- Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M., & Warwas, M. (2007). AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 77(2), 188-192.
- Précourt, L. P., Amre, D., Denis, M. C., Lavoie, J. C., Delvin, E., Seidman, E., y Levy, E. 2011. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 214(1): 20-36.
- Rozenberg, O., Rosenblat, M., Coleman, R., Shih, D. M., & Aviram, M. (2003). Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 774-784.
- Shih, D. M., L. Gu, S. Hama, Y-R. Xia, M. Navab, A. M. Fogelman, y A. J. Lusis. 1996. Genetic dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 97: 1630–1639.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., ... & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international*, 49(5), 1304-1313.
- Yuan, L., & Kaplowitz, N. (2009). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 29-41.

### 7.3 CAPÍTULO III. Efecto de los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* sobre la deposición de grasa y los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ , adiponectina y leptina en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas

#### RESUMEN

Un exceso de tejido adiposo provocado por las dietas altas en grasa tiene como consecuencia el desarrollo de enfermedades como obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares entre otras. El aumento de tejido adiposo tiene como consecuencia una respuesta proinflamatoria en la que ciertas adipocinas son expresadas por este como IL-6, TNF- $\alpha$  y leptina, por lo que buscar compuestos naturales que reduzcan los niveles de inflamación sin tener efectos secundarios es lo idóneo. En el presente estudio se determinó el efecto de los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* sobre los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina y adiponectina, así como en la deposición de grasa mediante cortes histológicos. Se usaron 6 grupos de ratas con una n=6 para cada grupo, el grupo I fue el control, el grupo II fue la DAG (63% de alimento Purina® Rodent Chow, 41.66% de grasa vegetal INCA®, 41.66% de manteca de cerdo y 16.66% de sacarosa). Los grupos III, VI, V, VI se alimentaron con la DAG más la administración oral diaria de los terpenos (1-8-cineol a 0.88 mg/kg, limoneno a 0.43 mg/kg,  $\alpha$ -terpineol a 0.32 mg/kg, y la mezcla terpénica de todos). Los resultados obtenidos demostraron que los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* tienen un efecto antiinflamatorio sobre los niveles de los biomarcadores de inflamación (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina y adiponectina), además mostraron tener un efecto sobre la deposición de grasa en el hígado.

**Palabras clave:** Compuestos naturales, inflamación, adipocinas.

## ABSTRACT

An excess of adipose tissue caused by high-fat diets has as a consequence the development of diseases such as obesity, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, among others. The increase in adipose tissue results in a pro-inflammatory response in which certain adipokines are expressed by it, such as IL-6, TNF- $\alpha$ , and leptin, so looking for natural compounds that reduce inflammation levels without having side effects would be the ideal. In the present study, the effect of the major terpenes of *Callistemon citrinus* on the levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , leptin, and adiponectin, as well as on the deposition of fat through histological sections, was determined. 6 groups of rats were used with n = 6 for each group, the group I was the control; group II was the DAG (63% Purina® Rodent Chow food, 41.66% INCA® vegetable fat, 41.66% butter pork and 16.66% sucrose); Groups III, IV, V, VI fed the DAG plus daily oral administration of terpenes: 1-8-cineol at 0.88 mg/kg, limonene at 0.43 mg/kg,  $\alpha$ -terpineol at 0.32 mg/kg, and terpenic mix. The results obtained showed that the majority of terpenes of *Callistemon citrinus* have an anti-inflammatory effect on the levels of adipokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptin, and adiponectin), and also showed to affect the deposition of fat in the liver.

**Keywords:** Natural compounds, Inflammation, Adipokines.

## INTRODUCCIÓN

La alimentación con dietas altas en grasa (DAG) puede inducir diversas patologías como obesidad y trastornos metabólicos en roedores que se asemejan al síndrome metabólico humano. Se ha discutido ampliamente sobre las dietas usadas para simular el deterioro metabólico observado en la obesidad humana siendo las DAG unas de las más propuestas (Buettner *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, los investigadores han optado por usar este tipo de dietas para generar modelos de roedores obesos, solo que se han utilizado una multitud de diferentes DAG con diferentes composiciones de grasa que varía de un entre 20% y 60% de energía en forma de grasa, además la grasa varía según organismo, por ejemplo, es diferente la composición de la manteca de cerdo o sebo de res que los aceites vegetales, etc. (Oakes *et al.*, 1997; Buettner *et al.*, 2007).

Por lo antes mencionado, las DAG suelen ser buenos modelos para inducir obesidad o patologías relacionadas a esta, ya que la respuesta inflamatoria se desencadena por un aumento exacerbado del tejido adiposo durante la obesidad (Wellen y Hotamisligil, 2003). La producción alterada de moléculas proinflamatorias (adipocinas) por el tejido adiposo, se ha visto relacionada con complicaciones metabólicas en la obesidad, en comparación con el tejido adiposo de las personas delgadas, el tejido adiposo de las personas obesas expresa un aumento de la cantidad de adipocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-6 (Hotamisligil *et al.*, 1995; Fried *et al.*, 1998).

Las adipoquinas proinflamatorias juegan un papel crucial en el metabolismo celular, el TNF- $\alpha$  disminuye directamente la sensibilidad a la insulina y aumenta la lipólisis en los adipocitos, mientras que la IL-6 ocasiona una hipertrigliceridemia al estimular la lipólisis y secreción de triacilglicéridos hepáticos (Nonogaki *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002). Por otro lado, existen otras adipoquinas relacionadas con la obesidad como la leptina, esta desempeña un papel importante en la homeostasis energética. En humanos con obesidad se ha determinado que existe un estado de resistencia a la leptina que conduce a la ingesta de más calorías, por lo que se pierde el efecto de tener una pérdida de peso

debido a la leptina, incrementando la probabilidad de tener enfermedades asociadas a la obesidad (Izquierdo *et al.*, 2019). No obstante, existen adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina que ha tenido un gran avance en el entendimiento del desarrollo de la resistencia a la insulina y enfermedades relacionadas con la obesidad (esteatosis hepática, enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y dislipidemia). Los bajos niveles de adiponectina se relacionan con patologías como aterosclerosis, diabetes tipo 2, entre otras. Además, se ha reportado que la adiponectina aumenta la expresión de moléculas involucradas en el transporte de ácidos grasos como CD36, también en el metabolismo de ácidos grasos en la acil-CoA oxidasa y en las proteínas desacoplantes (UCP 2), debido a lo anterior se demostró que estos cambios condujeron a una disminución del contenido de triacilglicéridos en el musculo esquelético (Kadowaki y Yamauchi, 2005; Yamauchi *et al.*, 2014). El objetivo del presente capítulo es determinar el efecto del 1,8-cineol, limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla sobre los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, adipocinas y leptina, así como en el contenido total de triacilglicéridos en el hígado de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, mantenidas en condiciones ambientales controladas (12 horas de luz/12 horas oscuridad, humedad relativa ente 60-70 %, Temperatura de 20°C, con libre acceso a comida y agua). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. El control de los animales y el proceso experimental se llevaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-ZOO-1999).

### **Modelo experimental**

Se utilizó el modelo experimental de Ortega-Perez *et al.*, (2020) con algunas modificaciones. Se usaron 36 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), divididas en 6 grupos con

una n=6 para cada grupo, con un peso inicial de 200-250 gramos y se usaron a las 8 semanas desde su gestación. La duración del modelo experimental fue de 15 semanas y los grupos experimentales fueron conformados de acuerdo con el **cuadro 2**. En cada uno de los grupos, diariamente se pesó y midió el consumo del alimento y agua, mientras que el peso de los animales fue semanalmente.

### **Estudio histológico**

Se colocaron pequeños trozos de un 1g aproximadamente de tejido hepático en frascos con formaldehído al 10% durante 48 horas. Después las muestras fueron embebidas en parafina, posteriormente se realizaron cortes transversales de 5 µm en un micrótopo. Una vez obtenidos los cortes se realizó una tinción de hematoxilina-eosina para su observación en el microscopio.

### **Preparación de los homogenados de hígado para los ELISAS**

Se lavaron los tejidos con PBS (1X, pH 7.4) para remover el exceso de sangre y se colocó 0.1 g de tejido en tubos eppendorf a -80°C. Añadimos 500 µl de buffer de extracción (100 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1mM EGTA; 1mM EDTA; 1% Triton X-100, 0.5%; 0.5% de desoxicolato de sodio). Se homogenizaron las muestras e inmediatamente se añadió un coctel de inhibidores de fosfatasa y proteasas (PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo a 1mM)). Se agitaron los homogenados a 320 r/minuto durante una hora y media a 4°C, después se centrifugaron las muestras a 10,000 g por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante.

### **Determinación de los niveles de IL-6, leptina, adiponectina y TNF-α**

La determinación de los niveles de IL-6, TNF-α, leptina y adiponectina fue cuantificado para homogenados por kits de ELISAS sandwich para homogenados de la marca SIGMA-ALDRICH®. El cual consistió en añadir 100 µl del homogenado en cada pozo e incubar durante 2.5 horas a temperatura ambiente con agitación a 100 r/minuto, después

se descartó la solución y realizaron 4 lavados con 300  $\mu$ l de buffer por pozo usando una pipeta multicanal. Después se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo biotinilado y se dejó incubar durante 1 hora en agitación suave, al término se descartó la solución y se realizaron lavados. Se colocaron 100  $\mu$ l de estreptavidina-HRP para cada pozo y se incubó durante 45 minutos en agitación suave. Se realizaron lavados, se agregó 100  $\mu$ l de TMB y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Añadimos 50  $\mu$ l HCl en cada pozo y se leyó la placa a 450 nm en un lector de ELISA marca Biorad ®.

### **Análisis estadístico**

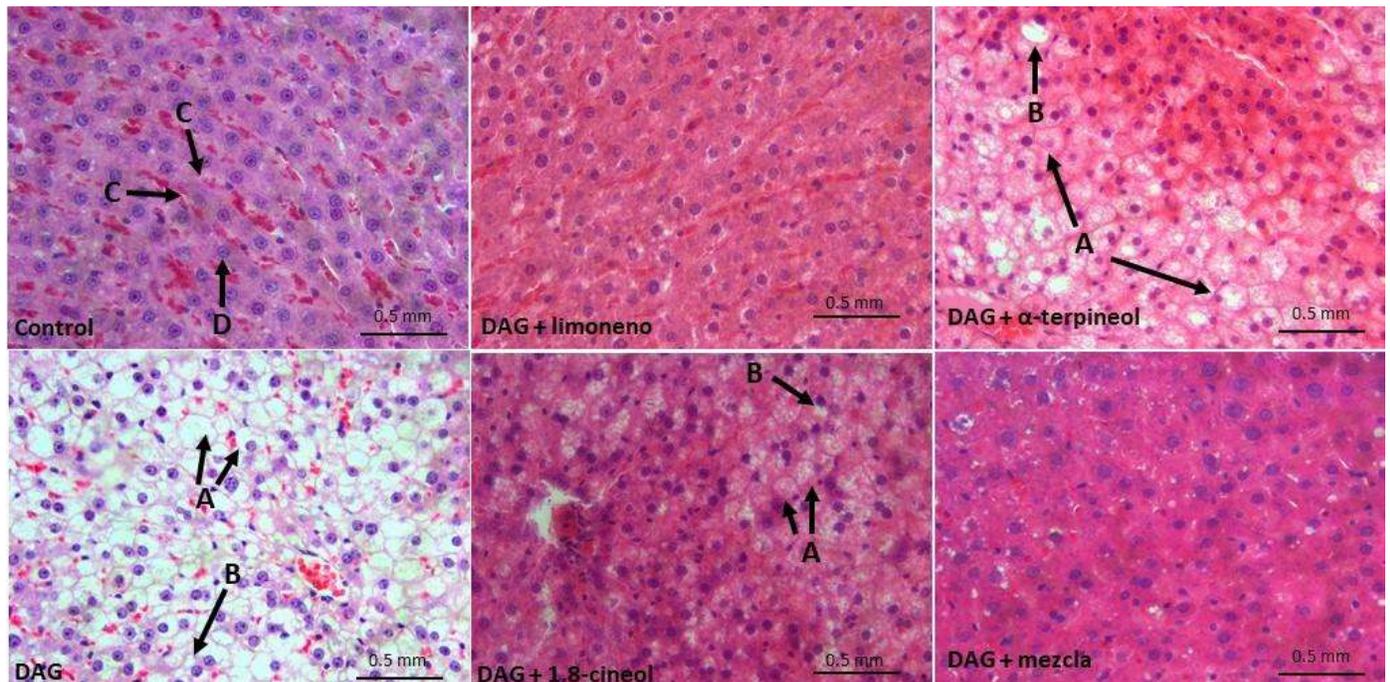
Los datos obtenidos fueron analizados y procesados utilizando el programa JMP 13 y el programa GraphPad Prism 8.0 para Windows. Fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), así como una prueba post hoc de Dunnett, con un valor de significancia \* $P \leq 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Acumulación de lípidos en el hígado**

Con el estudio histológico que se realizó **figura 12**, se observó que las ratas alimentadas con comida rodent chow Purina® (grupo control) mostraron tener una morfología tisular normal en forma de cordones (C), las células están alineadas, cuentan con un citoplasma delimitado entre cada núcleo y con núcleo redondeado de cromatina compacta (D). Por otro lado, en la dieta alta en grasas (DAG) se observa una acumulación excesiva de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos (microvesicular) (A) y fuera una acumulación de grasa macrovesicular (B), además de la pérdida de la arquitectura celular. La ingesta diaria vía oral de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* demostraron tener un efecto en la deposición de grasa del citoplasma de los hepatocitos, de los cuales el limoneno y la mezcla resultaron ser los mejores para evitar la acumulación de lípidos en el hígado, ya que la estructura del tejido es similar al del grupo control, no obstante, el 1,8-cineol y el  $\alpha$ -terpineol demostraron tener una acumulación de lípidos microvesicular y

macrovesicular en el tejido hepático, pero no de la misma manera que en el grupo de la DAG, por lo que tuvieron un efecto en la acumulación de lípidos, pero en menor magnitud.



**Figura 12.** Estudio histológico en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Se administró limoneno a 0.43 mg/kg,  $\alpha$ -terpineol a 0.32 mg/kg y 1,8-cineol a 0.88 mg/kg y en la mezcla terpénica (0.43 mg/kg de limoneno, 0.32 mg/kg de  $\alpha$ -terpineol y 0.88 mg/kg de 1,8-cineol). Las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina y eosina. Aumento de 40X. A: deposición microvesicular de grasa, B: deposición macrovesicular de grasa, C: morfología tisular normal en forma de cordones y D: núcleo redondeado de cromatina compacta.

En trabajos recientes se ha reportado que la administración oral del  $\alpha$ -terpineol durante 12 semanas a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/kg en modelos de dieta alta en grasas (37%), disminuye la deposición de grasa en el citoplasma de los adipocitos. En la presente investigación se encontró un efecto similar usando este terpeno a una concentración de 0.88 mg/kg (de Sousa *et al.*, 2020). En otro estudio en que se usó limoneno al 2% durante las últimas cuatro semanas en un modelo de dieta alta en grasas (42.2%), se determinó que disminuyó la acumulación de lípidos en el hígado (Santiago *et al.*, 2012), por lo que se observa este efecto con una a una administración oral del limoneno a una concentración de 0.43 mg/kg de peso, no obstante, se determinó un

efecto similar con el grupo de la mezcla terpénica, esto pudo darse porque esta mezcla contenía limoneno.

### **Determinación de los niveles de IL-6, leptina, adiponectina y TNF- $\alpha$**

Los niveles de la determinación de las adipoquinas se observaron en las **figuras 13, 14 y 16**. La IL-6, leptina y TNF- $\alpha$  mostraron un incremento en los niveles de estas adipoquinas, en el grupo DAG mientras que los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* redujeron los niveles de estas adipocinas a niveles inferiores al del grupo control. En la **figura 15** se observaron los niveles de adiponectina en los diferentes tratamientos, se encontró que la DAG disminuyó los niveles de esta adipocina, mientras que el 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, limoneno y la mezcla terpénica aumentaron los niveles de adiponectina y se comportaron de manera similar al grupo control.

En algunos trabajos se determinaron los niveles de las adipocinas en modelos de dietas altas en grasas. En uno de ellos con una dieta de 35% grasas con una duración de 12 semanas, usando  $\alpha$ -terpineol a diferentes dosis (25, 50 y 100 mg/kg), se determinó que la dieta aumentaba los niveles de las adipocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ . Sin embargo, el  $\alpha$ -terpineol a todas esas concentraciones disminuyó los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  (de Sousa *et al.*, 2020), dado que en este estudio se usó  $\alpha$ -terpineol a una concentración de 0.32 mg/kg se encontraron resultados similares en los niveles de la IL-6 y TNF- $\alpha$  por lo que los otros terpenos pudieran estar actuando de la misma manera.

En otros estudios con diversas patologías se reportaron actividades antiinflamatorias con otros terpenos como el 1,8-cineol, el cual probó en concentraciones de 2.5, 5 y 10  $\mu$ M en células PC12  $\beta$ -amiloide (células nerviosas de importancia para la enfermedad de Alzheimer) y se observó que disminuían los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Khan *et al.*, 2014), también se utilizó este terpeno a una dosis de 10mg/kg en ratones expuestos a humo de cigarro (12 cigarros por día) durante 5 días y se vió una disminución del 80% en los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Kennedy-Feitosa *et al.*, 2016). Por otro lado en un trabajo en el que se usó limoneno a 10 mg/kg en un modelo de estrés por inmovilización crónica durante 8 semanas se demostró que el limoneno reducía la expresión de genes que

codifican para la IL-6 y TNF- $\alpha$ , en los resultados obtenidos se observó una reducción de estas adipoquinas por lo que es posible que este efecto sea ocasionado por el limoneno (Son *et al.*, 2019).

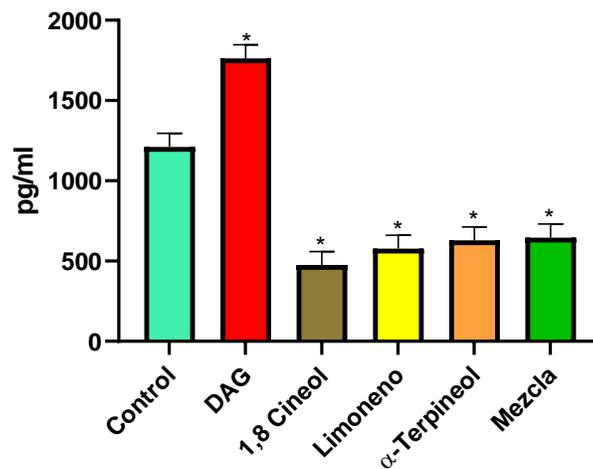
Para los niveles de la leptina se observó un aumento en los niveles con la DAG, esto se reportó en diversos trabajos ya que cuando existe una mala alimentación por dietas altas en grasa o hipercalóricas se induce una hiperleptinemia (Morales y Carvajal, 2010). Los altos niveles de leptina están relacionados a la obesidad alimentaria, debido a que en altas cantidades de tejido adiposo existe un aumento de estrés oxidativo e inflamación que activan la transcripción de genes para las proteínas PTP1B, SOCS3, LEPRB y TCPTP las cual evitan la activación óptima de los receptores de leptina desencadenando una resistencia (Coppari y Bjørnbæk, 2012).

La resistencia a la insulina predispone a los animales a una obesidad exacerbada tras la introducción posterior de una dieta tipo occidental. Por otro lado, se ha observado en animales alimentados con dietas altas en grasas con poca palatabilidad disminuye la ingesta energética, por lo que no se induce el consumo excesivo de alimentos (hiperfagia), aumento de peso y resistencia a la leptina (Shapiro *et al.*, 2011). En nuestro estudio se demostró que la DAG si induce una hiperfagia al momento de comparar la ingesta de comida y los niveles de leptina con el grupo control, además se demostró que los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* ejercen una actividad biológica con los niveles de leptina, esta puede ser debido a un aumento en síntesis de receptores de leptina, revirtiendo los daños de la insensibilidad hipotalámica, no obstante, al no haber reportes de los niveles de leptina con el uso de terpenos se desconoce la ruta que pudiera provocar este efecto biológico, también al haber una disminución de la ingesta con estos terpenos pudiera ser que revirtieran los daños ocasionados por una hiperfagia y de esa manera no inducir una resistencia a la leptina.

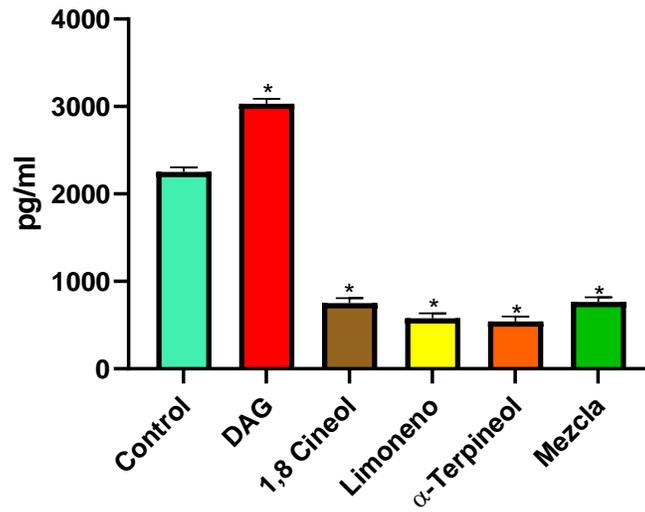
La adiponectina es una adipocina con propiedades antiinflamatorias, en diversos estudios se ha observado que en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (22%) durante 7 semanas mostraron tener niveles bajos en la expresión de adiponectina (Barnea *et al.*, 2010). Existen otros reportes en los que los niveles de adiponectina se

ven disminuidos con la alimentación de una dieta alta en grasas (20%) durante 15 semanas (Ha *et al.*, 2011). También se ha reportado que los niveles altos de adiponectina se asocian con un riesgo reducido de infarto de miocardio en hombres (Pischon *et al.*, 2004). Además, niveles bajos de adiponectina sérica se han determinado en individuos con patologías como obesidad, hipertensión, enfermedad de las arterias coronarias y diabetes tipo 2 (Pi-Sunyer, 2006).

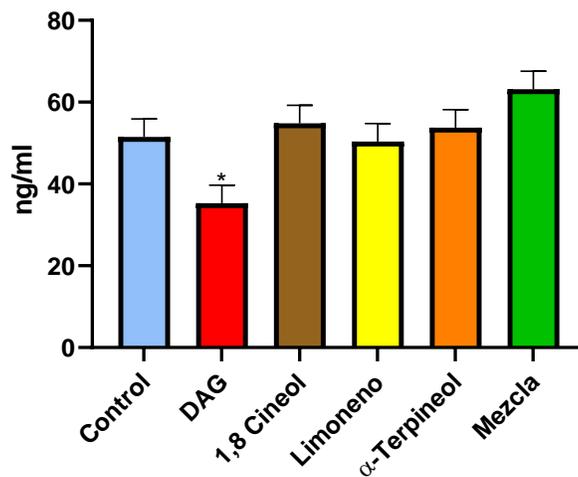
En los resultados obtenidos, los niveles de adiponectina disminuyeron en el grupo de las ratas alimentadas con la DAG por lo que la alimentación con esta dieta está provocando un aumento en la inflamación, aunque en todos los grupos tratados con los terpenos mayoritarios de *C. citrinus*, se observa un incremento de la adiponectina en comparación al grupo DAG. En los grupos con DAG más los terpenos, los niveles de la adiponectina son similares al del grupo control, por lo que los terpenos pudieran estar sintetizando niveles de adiponectina por el efecto antiinflamatorio que se observa, por otro lado, puede ser que también los niveles de adiponectina se observen aumentados por la poca ingesta de comida que desarrollaron estos grupos.



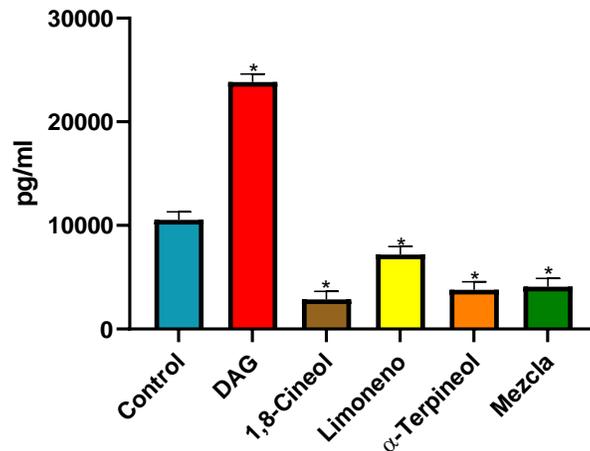
**Figura 13.** Niveles de IL-6 en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA, seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).



**Figura 14.** Niveles de leptina en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA, seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).



**Figura 15.** Niveles de adiponectina en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA, seguido de Dunnett,  $*p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).



**Figura 16.** Niveles de TNF- $\alpha$  en hígado de ratas control (no tratadas) y en tratadas con DAG (dieta alta en grasas) con los diferentes tratamientos experimentales (administración de terpenos), a las 15 semanas del experimento. Los valores se representan con media  $\pm$  error estándar (ANOVA, seguido de Dunnett, \* $p \leq 0.05$ ,  $n=6$ ).

## CONCLUSIÓN

Los terpenos mayoritarios de *Callistemon citrinus* demostraron tener un efecto antiinflamatorio en los niveles de las adipocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ , adiponectina y leptina). Sin embargo, el limoneno y la mezcla terpénica fueron los mejores grupos en los que se observó una menor deposición de grasa en los hepatocitos, no obstante, el  $\alpha$ -terpineol y el 1,8-cineol también tuvieron una menor deposición de grasa en comparación con el grupo de la DAG.

## REFERENCIAS

- Barnea, M., Madar, Z., & Froy, O. (2010). High-fat diet followed by fasting disrupts circadian expression of adiponectin signaling pathway in muscle and adipose tissue. *Obesity*, 18(2), 230-238.
- Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798-808.
- de Sousa, G. M., Cazarin, C. B. B., Junior, M. R. M., de Almeida Lamas, C., Quitete, V. H. A. C., Pastore, G. M., & Bicas, J. L. (2020). The effect of  $\alpha$ -terpineol enantiomers on biomarkers of rats fed a high-fat diet. *Heliyon*, 6(4), e03752.

- Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(3), 847-850.
- Ha, S. K., Kim, J., & Chae, C. (2011). Role of AMP-activated protein kinase and adiponectin during development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced obesity in rats. *Journal of comparative pathology*, 145(1), 88-94.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 95(5), 2409-2415.
- Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F., & Carreira, M. C. (2019). Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later?. *Nutrients*, 11(11), 2704.
- Kadowaki, T., & Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*, 26(3), 439-451.
- Kennedy-Feitosa, E., Okuro, R. T., Ribeiro, V. P., Lanzetti, M., Barroso, M. V., Zin, W. A., ... & Valenca, S. S. (2016). Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 41, 11-18.
- Khan, A., Vaibhav, K., Javed, H., Tabassum, R., Ahmed, M. E., Khan, M. M., ... & Islam, F. (2014). 1, 8-cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid Beta toxicated PC12 cells: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 39(2), 344-352.
- Morales Clavijo, M., & Carvajal Garcés, C. F. (2010). Obesidad y resistencia a la leptina. *Gaceta médica boliviana*, 33(1), 63-68.
- Nonogaki, K., Fuller, G. M., Fuentes, N. L., Moser, A. H., Staprans, I. L. O. N. A., Grunfeld, C. A. R. L., & Feingold, K. R. (1995). Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*, 136(5), 2143-2149.
- Oakes, N. D., Cooney, G. J., Camilleri, S., Chisholm, D. J., & Kraegen, E. W. (1997). Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes*, 46(11), 1768-1774.
- Pischon, T., Girman, C. J., Hotamisligil, G. S., Rifai, N., Hu, F. B., & Rimm, E. B. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama*, 291(14), 1730-1737.
- Pi-Sunyer, F. X. (2006). The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. *Clinical Cornerstone*, 8, S14-S23.
- Santiago, J. V. A., Jayachitra, J., Shenbagam, M., & Nalini, N. (2012). Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats. *European journal of nutrition*, 51(1), 57-68.
- Shapiro, A., Tümer, N., Gao, Y., Cheng, K. Y., & Scarpace, P. J. (2011). Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *British Journal of Nutrition*, 106(3), 390-397.
- Son, H., Yang, J. H., Kim, H. J., & Lee, D. K. (2019). A chronic immobilization stress protocol for inducing depression-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (147), e59546.

- Wellen, K. E., & Hotamisligil, G. S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1785-1788.
- Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., & Kadowaki, T. (2014). Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 28(1), 15-23.
- Zhang, H. H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C., & Greenberg, A. S. (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*, 51(10), 2929-2935.

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

La mala alimentación por dietas altas en grasa (DAG) ha representado una gran problemática en los últimos años debido a las patologías asociadas por una mala alimentación. Por lo anterior, se han hecho estudios experimentales con animales simulando las DAG para inducir patologías relacionadas por una mala alimentación (Buettner *et al.*, 2007). Existen trabajos de modelos de DAG en los que se miden biomarcadores de estrés oxidativo como MDA, HNE, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), entre otros (Noeman *et al.*, 2011). Sin embargo, no hay existe mucha información reciente acerca de los parámetros morfométricos (índice de Lee y adiposidad) en modelos de DAG.

Con el estudio realizado se determinó el efecto antioxidante de los compuestos mayoritarios del extracto de *C. citrinus* en el hígado de ratas alimentadas con una DAG. 1-8-Cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno se les ha atribuido tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, no obstante, existen muy pocos estudios realizados en el hígado en modelos de DAG. No existen reportes de que estos compuestos tengan una capacidad inhibitoria hacia la  $\alpha$ -glucosidasa; sin embargo, se determinó una disminución de glucosa en sangre con la administración oral de estos compuestos. En otras investigaciones se ha encontrado que con el extracto de *C. citrinus* existe una capacidad inhibitoria a esta enzima, ya que esta tiene función en la absorción de carbohidratos y de glucosa gastrointestinal (Fayemi *et al.*, 2019). Otro posible mecanismo de acción de estos terpenos es por la reducción en la ingesta de alimento, en la cual se observan niveles bajos de glucosa y triacilglicéridos. Además, de una disminución en el índice de adiposidad por parte del limoneno,  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica.

Por otro lado, los biomarcadores de estrés oxidativo juegan un papel crucial en el estatus oxidativo generado por las dietas altas en grasa, un desbalance de grasas y estrés oxidativo en el hígado puede generar daños perjudiciales en las biomoléculas de los adipocitos, lo que genera cambios en el funcionamiento y homeostasis celular de estos

(Kohen y Nyska, 2002; Matsuda y Shimomura, 2013). Los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* demostraron tener una actividad antioxidante en algunos de ellos.

Para los niveles de HNE y MDA, en diversos trabajos se ha visto un aumento de estos en patologías como la obesidad, esteatosis hepática, entre otras. El 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno demostraron bajar los niveles de estos compuestos tóxicos, hay reportes de que el 1,8-cineol y limoneno incrementan las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Santos *et al.*, 2004; Roberto *et al.*, 2010). Al incrementar los niveles de estas enzimas antioxidantes se está evitando la formación del radical hidroxilo, este mecanismo puede ser el responsable de disminuir los niveles de MDA y HNE, además el  $\alpha$ -terpineol puede atenuar o estabilizar los radicales hidroxilo por la estructura química por la que cuenta; sin embargo, no existen reportes sobre la actividad antioxidante de este compuesto en la formación de MDA y HNE.

Para los niveles de AOPP no existe algún reporte de algún estudio en los que se usaran los terpenos mayoritarios de *C. citrinus*, no obstante, estos compuestos demostraron evitar la oxidación de proteínas, el mecanismo posible por el cual estén actuando es que debido a los reportes en el aumento de los niveles de las enzimas SOD, CAT y GPx se esté produciendo una menor cantidad de peróxido de hidrogeno (Santos *et al.*, 2004; Roberto *et al.*, 2010), el cual reacciona con la mieloperoxidasa para producir ácido hipocloroso y este último es el responsable de ocasionar el daño a las proteínas.

En los niveles de glutatión reducido en todos los grupos con los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* se observó una disminución en los niveles, esto se debió a que el estrés oxidativo de la dieta descompensa el estado redox de este sustrato, pero se tendrían que hacer estudios posteriores midiendo la actividad de la GPx y la glutatión-S-transferasa de esta manera se tendría un panorama más amplio sobre el mecanismo de acción de los terpenos y la DAG. Sin embargo, no existen reportes con el 1,8-cineol ni el  $\alpha$ -terpineol acerca de un posible mecanismo, con el limoneno se han hecho estudios en modelos de diabetes en los cuales se ha demostrado que los niveles de GSH y GPx con una

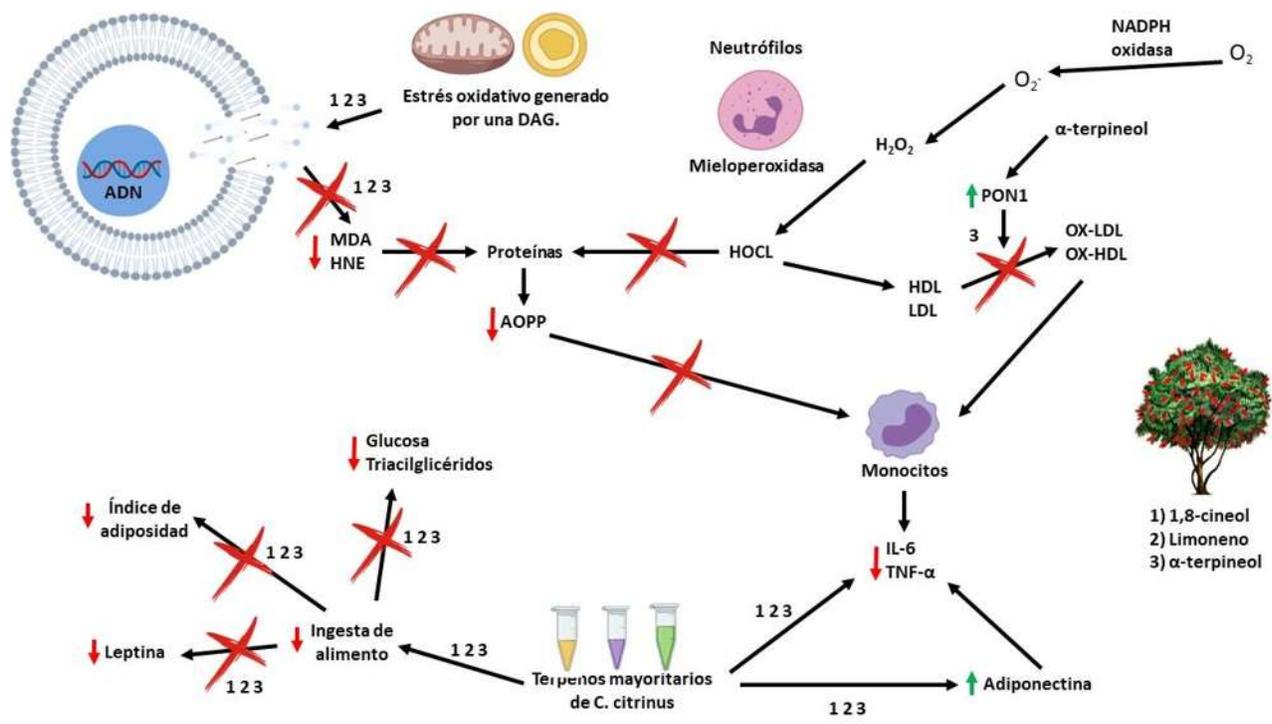
administración a una concentración de 50 mg/kg de peso durante 45 días se encontraron niveles bajos, no obstante, se determinó un aumento en la enzima glutatión-S-transferasa (Bacanli *et al.*, 2017).

En los niveles de la PON1 se determinó que en el grupo del  $\alpha$ -terpineol y la mezcla terpénica aumentan los niveles de esta enzima encargada de prevenir la oxidación de lipoproteínas, se ha reportado que el extracto de *C. citrinus* ayuda a incrementar los niveles de la PON1 en el hígado de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica (Ortega-Pérez, 2020). Debido a que el  $\alpha$ -terpineol es uno de los compuestos mayoritarios de este extracto puede ser que este sea uno de los compuestos responsables de incrementar la síntesis de la PON1.

En cambio, en el estudio de los cortes histológicos se pudo observar una menor deposición de grasa en todos los tratamientos de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus*, esto posiblemente se deba a que ingirieron una menor cantidad de alimento por acción de todos los terpenos, existen estudios con el  $\alpha$ -terpineol a una concentración de 25, 50 y 100 mg/kg en donde se observó de la misma manera una disminución en la ingesta de alimento en un modelo de DAG (de Sousa *et al.*, 2020).

Asimismo, se determinó los niveles de los marcadores de inflamación (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina y adiponectina), por lo que se sugiere que los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* tienen un efecto antiinflamatorio. Existen trabajos en los que se usa el limoneno a una concentración de 50 y 100 mg/kg de peso durante 7 días en un modelo de colitis y determinaron que la expresión en los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  disminuye. Además, se han encontrado reportes de que el  $\alpha$ -terpineol ayuda a disminuir los niveles de TNF- $\alpha$  evitando la acumulación de lípidos en el hígado por medio de una disminución en la ingesta de alimentos, por lo que este puede ser el mecanismo de acción de este compuesto (de Sousa *et al.*, 2020). No obstante, el 1,8-cineol puede que esté actuando de la misma manera que los otros terpenos mayoritarios de *C. citrinus*.

En la figura 18 se propone un mecanismo por el cual los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* podrían estar actuando como compuestos antioxidantes y antiinflamatorios con base en los experimentos realizados en el presente trabajo.



**Figura 18.** Propuesta del mecanismo de acción de los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* en un modelo de DAG (Dieta alta en grasas). En 1,8-cineol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol disminuyen la producción de MDA, HNE, AOPP,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$ , glucosa, triacilglicéridos, leptina, ingesta de alimento e índice de adiposidad, además incrementan los niveles de Adiponectina durante la alimentación de una DAG, sin embargo, solo el  $\alpha$ -terpineol incrementan los niveles de la PON1.

## 9. CONCLUSIÓN GENERAL

Los terpenos mayoritarios de *C. citrinus* demostraron tener un efecto antioxidante y antiinflamatorio, así como brindar una defensa contra el daño oxidativo y la deposición de grasa en el hígado generada por un modelo de DAG.

## 10. REFERENCIAS GENERALES

- Akkol, E. K., Avcı, G., Küçük Kurt, I., Keleş, H., Tamer, U., Ince, S., & Yesilada, E. (2009). Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. *Journal of ethnopharmacology*, 126(2), 314-319.
- Aladaileh, S. H., Saghir, S. A., Murugesu, K., Sadikun, A., Ahmad, A., Kaur, G., ... & Murugaiyah, V. (2019). Antihyperlipidemic and antioxidant effects of *averrhoa carambola* extract in high-fat diet-fed rats. *Biomedicines*, 7(3), 72.
- Arredondo-Espinoza, E. U. 2011. Evaluación del efecto anticancerígeno y citotóxico in vitro de la porfirina no simétrica A3B NS1 en el compuesto HS01 de la planta *Hibiscus sabdariffa* y la proteína quimérica E2-IL-18. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México.
- Aviram, M., M. Rosenblat, S. Billecke, J. Erogul, R. Sorenson, C. L. Bisgaier, R. S. Newton, y B. La Du. 1999. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26. 892–904.
- Azerad, R. (2014). 1, 8-Cineole: chemical and biological oxidation reactions and products. *Chempluschem*, 79(5), 634.
- Bacanli, M., Anlar, H. G., Aydın, S., Çal, T., Ari, N., Bucurgat, Ü. & Başaran, N. (2017). D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 434-442.
- Bastos, V. P., Gomes, A. S., Lima, F. J., Brito, T. S., Soares, P. M., Pinho, J. P., ... & Magalhães, P. J. (2011). Inhaled 1, 8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of Ovalbumin-challenged Guinea Pigs. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 108(1), 34-39.
- Beltowski, J., Wojcicka, G., Gorny, D., & Marciniak, A. (2000). The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(4, 2).
- Bhowal, M., & Gopal, M. (2015). Eucalyptol: Safety and pharmacological profile. *J. Pharm. Sci*, 5, 125-131.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Brown, S. K., Garver, W. S., & Orlando, R. A. (2017). 1, 8-cineole: An Underappreciated Anti-inflammatory Therapeutic. *J Biomol Res Ther* 6: 154.
- Browne, R. W., & Armstrong, D. (1998). Reduced glutathione and glutathione disulfide. In *Free radical and antioxidant protocols* (pp. 347-352). Humana Press.
- Buettner, R., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798-808.
- Butturini, E., Cavalieri, E., de Prati, A. C., Darra, E., Rigo, A., Shoji, K. & Mariotto, S. (2011). Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One*, 6(5), e20174.

- Calder, P. C. (2009). Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *International reviews of immunology*, 28(6), 506-534.
- Calder, P. C. (2011). Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *European journal of pharmacology*, 668, S50-S58.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296(5573), 1634-1635.
- Coppari, R., & Bjørnbæk, C. (2012). Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nature reviews Drug discovery*, 11(9), 692-708.
- C. (2012). Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nature reviews Drug discovery*, 11(9), 692-708.
- de Oliveira, M. G., Marques, R. B., de Santana, M. F., Santos, A. B., Brito, F. A., Barreto, E. O., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2012).  $\alpha$ -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 111(2), 120-125.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4), 316-328.
- Diniz, Y. S. A., Cicogna, A. C., Padovani, C. R., Santana, L. S., Faine, L. A., & Novelli, E. L. (2004). Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition*, 20(2), 230-234.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*.
- el Imane Harrat, N., Louala, S., Bensalah, F., Affane, F., Chekkal, H., & Lamri-Senhadjji, M. (2019). Anti-hypertensive, anti-diabetic, hypocholesterolemic and antioxidant properties of prickly pear nopalitos in type 2 diabetic rats fed a high-fat diet. *Nutrition & Food Science*.
- Endalifer, M. L., & Diress, G. (2020). Epidemiology, predisposing factors, biomarkers, and prevention mechanism of obesity: a systematic review. *Journal of obesity*, 2020.
- Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., & Giugliano, D. (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama*, 289(14), 1799-1804.
- Fainstein, K., & Aguilar-Maldonado, B. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas (No. Sirsi) i9789707293212).
- Fayemi, P. O., Ozturk, I., Kaan, D., Özcan, S., Yerer, M. B., Dokumaci, A. H., ... & Yetim, H. (2019). Bioactivities of phytochemicals in *Callistemon citrinus* against multi-resistant foodborne pathogens, alpha glucosidase inhibition and MCF-7 cancer cell line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 764-778.
- Ferré N., J. Camps, E. Prats, E. Vilella, A. Paul, L. Figuer y J. Joven. 2002. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48: 261-268.
- Folmer, V., Soares, J. C., Gabriel, D., & Rocha, J. B. (2003). A high fat diet inhibits  $\delta$ -aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *The Journal of nutrition*, 133(7), 2165-2170.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and

- regulation by glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(3), 847-850.
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.
- Gewirtz, A.T., Collier-Hyams, L.S., Young, A.N., Kucharzik, T., Guilford, W.J., Parkinson, J.F., Williams, I.R., Neish, A.S., Madara, J.L., 2002. Lipoxin A4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Immunol.* 168, 5260–5267.
- Golshani S, Karamkhani F, Monsef-Esfehani H-Z, Abdollahi M. (2004) Antinociceptive effect of the essential oil of *Dracocephalum kotschyi* in the mouse writhing test. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 7, 76-79.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Gøransson, L. G., Brede, C., & Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica chimica acta*, 413(9-10), 901-906.
- Hassan SB, Gali-Muhtasib H, Goransson H, Larsson R (2010) Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappa B signalling. *Anticancer Res* 30:1911–1919
- Held, S., Schieberle, P., & Somoza, V. (2007). Characterization of  $\alpha$ -Terpineol as an Anti-inflammatory Component of Orange Juice by in Vitro Studies Using Oral Buccal Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8040- 8046.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., ... & Shimomura, I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56(4), 901-911.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
- Ibarra, A., Cases, J., Roller, M., Chiralt-Boix, A., Coussaert, A., & Ripoll, C. (2011). Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 106(8), 1182-1189.
- Johnston, J.W., Horne, S., Harding, K., Benson, E.E. 2007. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: Malodialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45,108-112.
- Kalousová, M., Fialová, L., Skrha, J., Zima, T., Soukupová, J., Malbohan, I. M., & Stipek, S. (2004). Oxidative stress, inflammation and autoimmune reaction in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep*, 105(1), 21-28.
- Kaneda, H., Taguchi, J., Ogasawara, K., Aizawa, T., & Ohno, M. (2002). Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 162(1), 221-225.
- Kesh, S. B., Sarkar, D. E. B. A. S. H. R. E. E., & Manna, K. R. I. S. H. N. E. N. D. U. (2016). High-fat diet-induced oxidative stress and its impact on metabolic syndrome: a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 9(1), 47-52.

- Kim, H. J., Higashimori, T., Park, S. Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y. J., ... & Kim, J. K. (2004). Differential effects of interleukin-6 and-10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*, 53(4), 1060-1067.
- Klesges, R. C., Klesges, L. M., Haddock, C. K., & Eck, L. H. (1992). A longitudinal analysis of the impact of dietary intake and physical activity on weight change in adults. *The American journal of clinical nutrition*, 55(4), 818-822.
- Kohen, R., Nyska, A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*. 30(6): 620-650.
- Kudchodkar, B.J., Lacko, A.G., Dory, L., Fungwe, T.V. 2000. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *The Journal of Nutrition Journal*. 2427-2433
- Kumar B., Vijayakumar M., Govindarajan R. y Pushpangadan. P. 2007. Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *Journal Ethnopharmacology*. 114:103.
- La Du, B. N. 1996. Structural and functional diversity of paraoxonase. *Nat. Med.* 2: 1186–1187.
- Lachance, P., Bonnefoy, M., Draï, J., Kostka, T. 2002. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 31, 1174-84.
- Le Lay, S., Simard, G., Martinez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
- Lee, C. Y. (2013). The effect of high-fat diet-induced pathophysiological changes in the gut on obesity: what should be the ideal treatment?. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 4(7), e39.
- Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., Serhan, C.N., 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* 2, 612–619.
- Lewis, R.A., Austen, K.F., Soberman, R.J., 1990. Leukotrienes and other products of the 5- lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 323, 645–655.
- Li, W., Zhang, K., & Yang, H. (2018). Pectin alleviates high fat (lard) diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice: possible role of short-chain fatty acids and gut microbiota regulated by pectin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(30), 8015-8025.
- Liu, H., Han, T., Tian, J., Zhu, Z. Y., Liu, Y., Li, Y., ... & Feng, Y. Y. (2012). Monitoring oxidative stress in acute-on-chronic liver failure by advanced oxidation protein products. *Hepatology Research*, 42(2), 171-180.
- López-Mejía, A., Ortega-Pérez, L. G., Godínez-Hernández, D., Nateras-Marin, B., Meléndez-Herrera, E., Ríos-Chavez, P. 2019. Chemopreventive effect of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels against colon cancer induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rats. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 145(6): 1417-1426.
- Mackness, M. I., B. Mackness, P. N. Durrington, P. W. Connelly, y R. A. Hegele. 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 7: 69–76.

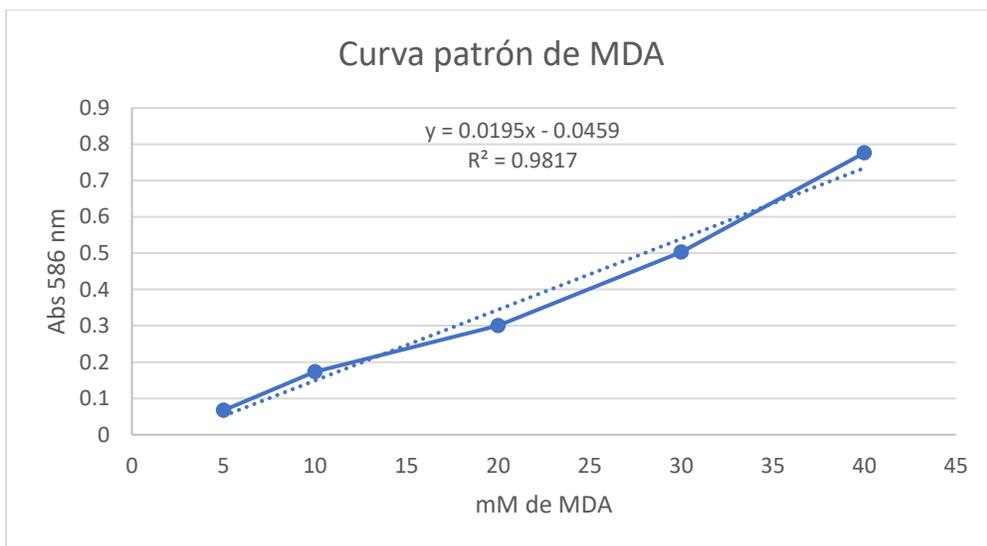
- Magaña-Rodríguez O. R. 2018. Evaluación del estrés oxidativo en el hígado de rata con cáncer de colon. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
- Makki, K., Froguel, P., & Wolowczuk, I. (2013). Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Matsuda, M., Shimomura, I. 2013. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity research & clinical practice*. 7(5): e330-e341.
- Matthews, V. B., Allen, T. L., Risis, S., Chan, M. H. S., Henstridge, D. C., Watson, N., ... & Febbraio, M. A. (2010). Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*, 53(11), 2431-2441.
- Mehta, R. S., Gunnnett, C. A., Harris, S. R., Bunce, O. R., & Hartle, D. K. (1994). High fish oil diet increases oxidative stress potential in mammary gland of spontaneously hypertensive rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 21(11), 881-889.
- Mert, H., Comba, B., Mert, N., Çınar, D. A., & Apaydın Yıldırım, B. (2016). Advanced oxidation protein products (AOPP) levels and kidney function in fluorotic sheep. *Fluoride*, 49(3 Pt 2), 336-42.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- Miller, W. C., Lindeman, A. K., Wallace, J., & Niederpruem, M. (1990). Diet composition, energy intake, and exercise in relation to body fat in men and women. *The American journal of clinical nutrition*, 52(3), 426-430.
- Miyazawa, M., Shindo, M., & Shimada, T. (2001). Oxidation of 1, 8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from *Eucalyptus polybractea*, by cytochrome P450 3A enzymes in rat and human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(2), 200-205.
- Nguyen, S. D., y Sok, D. E. 2003. Oxidative inactivation of paraoxonase1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free radical research*. 37(12): 1319-1330.
- Noeman, S. A., Hamooda, H. E., & Baalash, A. A. (2011). Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & metabolic syndrome*, 3(1), 1-8.
- Ortega Pérez, L. G. (2020). Efecto del extracto de *Callistemon citrinus* sobre el estrés oxidativo en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology*, 11(2), 85-97.
- Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K. Y., Chung, H. Y., & Lee, J. (2010). A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters*, 482(3), 235-239.
- Petronilho S, Rocha SM, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Rios-Chavez P Assessment of the terpenic profile of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels from Mexico. *Industrial Crops and Products Journal*. No 46. 369-379 (2013).

- Piowar, A., Knapik-Kordecka, M., & Warwas, M. (2007). AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 77(2), 188-192.
- Pradhan, A. D., Manson, J. E., Rifai, N., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2001). C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama*, 286(3), 327-334.
- Précourt, L. P., Amre, D., Denis, M. C., Lavoie, J. C., Delvin, E., Seidman, E., y Levy, E. 2011. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 214(1): 20-36.
- Prewitt, T. E., Schmeisser, D., Bowen, P. E., Aye, P., Dolecek, T. A., Langenberg, P., ... & Brace, L. (1991). Changes in body weight, body composition, and energy intake in women fed high-and low-fat diets. *The American journal of clinical nutrition*, 54(2), 304-310.
- Quintans-Júnior, L. J., Oliveira, M. G., Santana, M. F., Santana, M. T., Guimarães, A. G., Siqueira, J. S., ... & Almeida, R. N. (2011).  $\alpha$ -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharmaceutical Biology*, 49(6), 583-586.
- Ribeiro, T. P., Porto, D. L., Menezes, C. P., Antunes, A. A., Silva, D. F., De Sousa, D. P., ... & Medeiros, I. A. (2010). Unravelling the cardiovascular effects induced by  $\alpha$ -terpineol: A role for the nitric oxide–cGMP pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(8), 811-816.
- Roberto, D., Micucci, P., Sebastian, T., Graciela, F., & Anesini, C. (2010). Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulation and cell proliferation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 106(1), 38-44.
- Rodríguez, S. D., Von Staszewski, M., & Pilosof, A. M. (2015). Green tea polyphenols-whey proteins nanoparticles: Bulk, interfacial and foaming behavior. *Food hydrocolloids*, 50, 108-115.
- Rozenberg, O., Rosenblat, M., Coleman, R., Shih, D. M., & Aviram, M. (2003). Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 774-784.
- Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibazaki, S., Takahashi, M., ... & Funahashi, T. (2004). Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circulation journal*, 68(11), 975-981.
- Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(4), 240-244.
- Sedlak, J., y Lindsay, R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 25: 192-205
- Sentí M, Tomás M, Fitó M, Weinbrenner T, Covas M, Sala J, Masiá R, Marrugat J: Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol & Metab* 2003, 88:5422-5426
- Shih, D. M., L. Gu, S. Hama, Y-R. Xia, M. Navab, A. M. Fogelman, y A. J. Lusis. 1996. Genetic dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 97: 1630–1639.

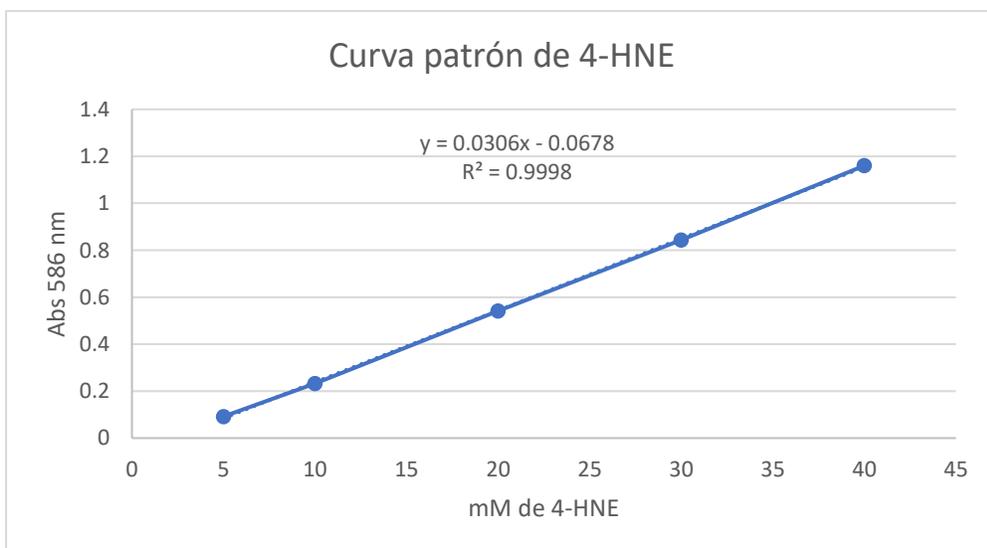
- Spector, A. A. (1999). Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34(1), S1-S3.
- Tilley, S.L., Coffman, T.M., Koller, B.H., 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.* 108, 15–23.
- Umar, I. A., Mohammed, A., Dawud, F. A., Kabir, A. M., Sai, J. V., Muhammad, F. S., & Okalor, M. E. (2012). The hypolipidemic and antioxidant actions of aqueous extracts of *Ocimum basilicum* and *Ocimum suave* in high fat fed Rats. *J Med Plants Res*, 6(18), 3501-3505.
- Vendrell, J., Broch, M., Vilarrasa, N., Molina, A., Gómez, J. M., Gutiérrez, C., ... & Richart, C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity research*, 12(6), 962-971.
- Walczewska, A., Dziedzic, B., Stepien, T., Swiatek, E., & Nowak, D. (2010). Effect of dietary fats on oxidative-antioxidative status of blood in rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 1004220024-1004220024.
- Watson, A. D., J. A. Berliner, S. Y. Hama, B. N. La Du, K. F. Fauli, A. M. Fogelman, y N. Mohamad. 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J.Clin. Invest.* 96: 2882–2891
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., ... & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney international*, 49(5), 1304-1313.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139-162.
- Yuan, L., & Kaplowitz, N. (2009). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 29-41.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432.
- Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., ... & Giugliano, D. (2002). Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*, 105(7), 804-809.

## 11. ANEXOS

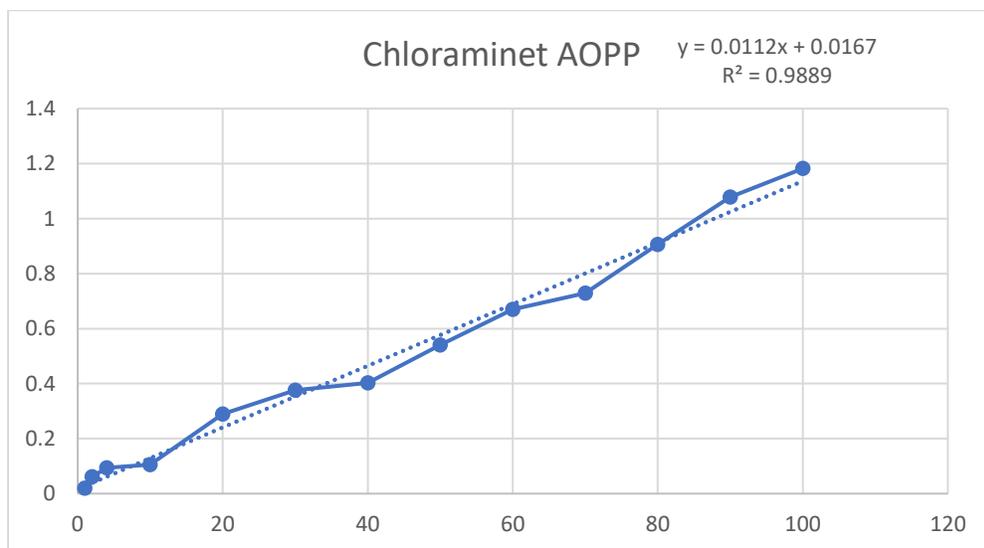
### Anexo 1. Curva patrón para la cuantificación de MDA.



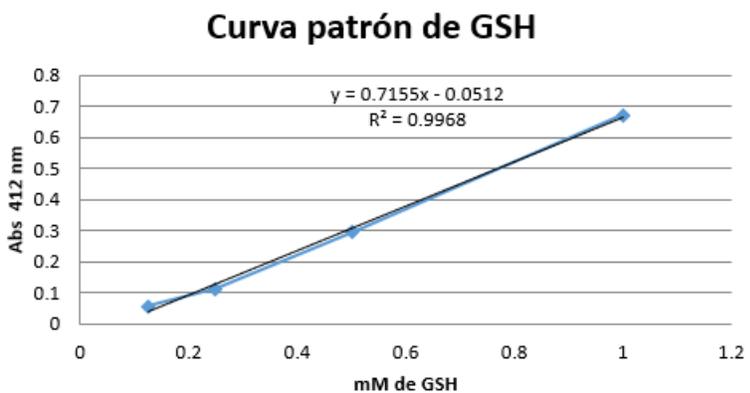
### Anexo 2. Curva patrón para la cuantificación de 4-HNE.



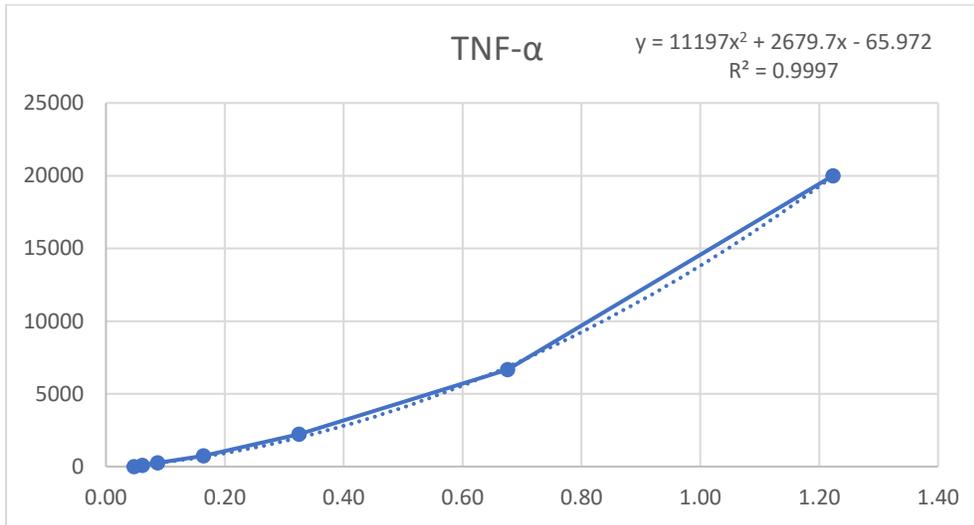
### Anexo 3. Curva patrón para la cuantificación de AOPP.



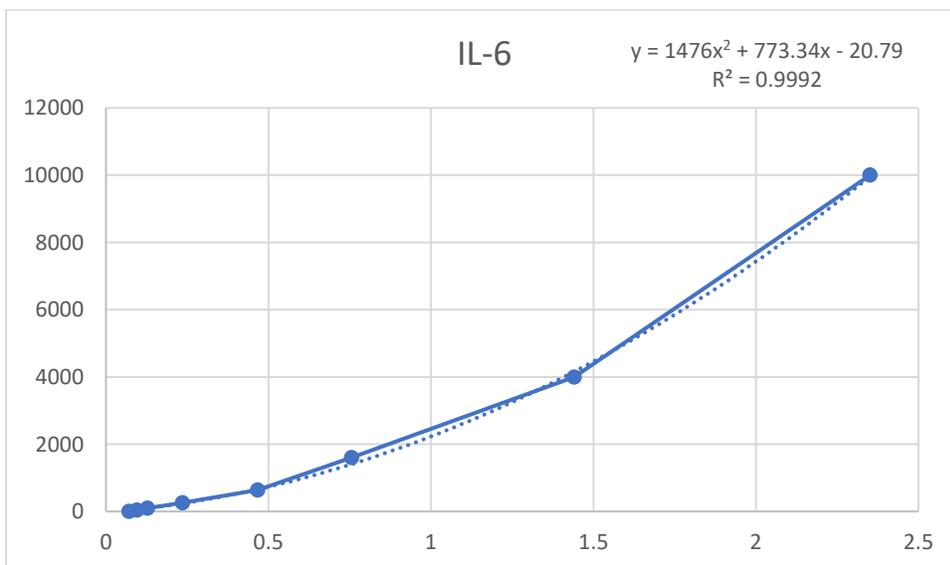
### Anexo 4. Curva patrón para la cuantificación de GSH.



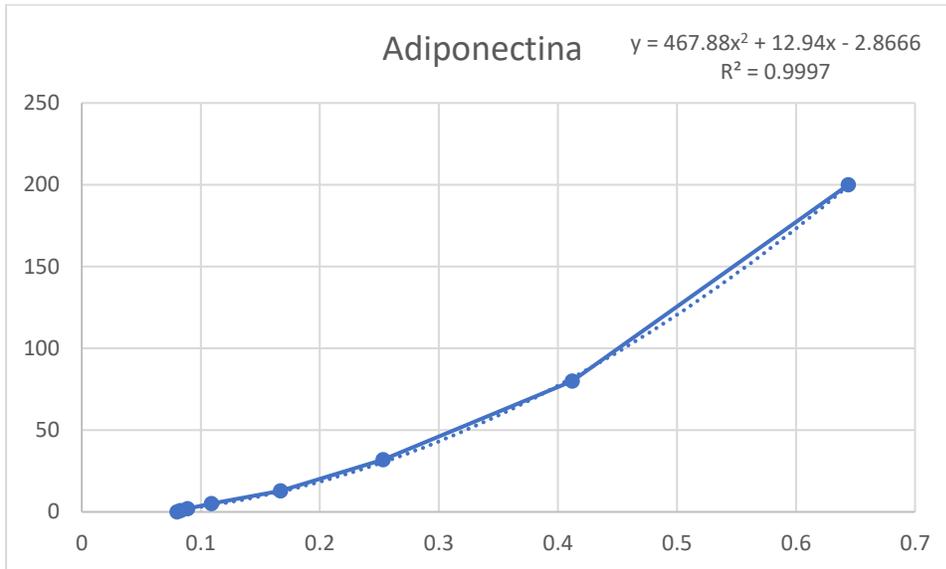
**Anexo 5. Curva patrón para la cuantificación de TNF- $\alpha$ .**



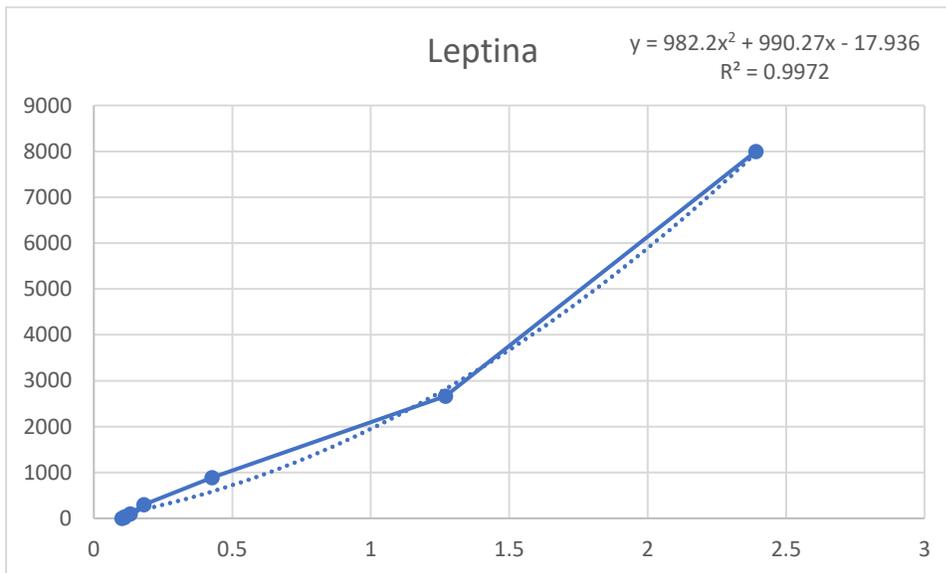
**Anexo 6. Curva patrón para la cuantificación de IL-6.**



**Anexo 7. Curva patrón para la cuantificación de Adiponectina.**



**Anexo 8. Curva patrón para la cuantificación de Leptina.**



**Anexo 9.** Curva patrón para la cuantificación de proteínas totales.

