



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
División de Estudios de Posgrado



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE BIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Efecto del extracto de *Callistemon citrinus* sobre el estrés oxidativo
en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica”**

TESIS

Que como requisito para obtener el grado académico de:
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:
Biól. Luis Gerardo Ortega Pérez

Asesor:
D.C. Patricia Ríos Chávez

Morelia, Michoacán, México, Febrero de 2020



ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
1.Introducción general	1
1.1. Sistemas antioxidantes, detoxificantes y radicales libres	2
1.2. Sobrepeso y obesidad	5
1.2.1. Modelos de inducción de obesidad con dietas hipercalóricas	6
1.2.2. Uso de estatinas durante el sobrepeso y la obesidad	7
1.3. Plantas medicinales, capacidad antioxidante y protectora	9
1.4. <i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	11
1.4.1. Características de <i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	12
2. Justificación	13
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos específicos	14
5. Estrategia Experimental	15
6. Resultados	16
6.1. Capítulo I. Efecto del extracto de hoja de <i>C. citrinus</i> sobre los parámetros morfométricos y bioquímicos en las ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.	16
RESUMEN	16
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	17
METODOLOGÍA	18
Colecta del material biológico y preparación del extracto de hoja	18
Animales	18
Modelo de dieta hipercalórica	19

Medición de parámetros morfométricos y bioquímicos	20
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	25
LITERATURA CITADA DE CAPÍTULO I.	26
6.2. Capítulo II. Efecto del extracto de hoja de <i>C. citrinus</i> sobre los marcadores del estrés oxidativo en el hígado y corazón de ratas obesas por una dieta hipercalórica.	29
RESUMEN	29
ABSTRACT	29
INTRODUCCIÓN	30
METODOLOGÍA	30
Modelo experimental de obesidad en rata Wistar por dieta hipercalórica	30
Preparación de homogenados de hígado y corazón para proteínas carboniladas, glutatión reducido, malondialdehído y 4-hidroxinonenal.	30
Proteínas totales	31
Técnica de malondialdehído y 4-hidroxinonenal	31
Técnica de proteínas carboniladas	31
Técnica de glutatión reducido	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS	33
Malondialdehído y 4-hidroxinonenal	33
Proteínas carboniladas	35
Glutatión reducido	36
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	38
LITERATURA CITADA DE CAPÍTULO II.	39
6.3. Capítulo III. Efecto del extracto etanólico de hoja de <i>C. citrinus</i> sobre las actividades de las enzimas antioxidantes y detoxificante en el hígado y corazón en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.	42

RESUMEN	42
ABSTRACT	42
INTRODUCCIÓN	43
METODOLOGÍA	43
Proteínas totales	43
Determinación de la Superóxido dismutasa (SOD)	43
Determinación de la Catalasa (CAT)	44
Determinación de la Glutación peroxidasa (GPx)	44
Determinación de la Glutación-S-transferasa (GST)	44
Determinación de la Paraoxonasa (PON1)	45
Análisis estadístico	45
RESULTADOS	45
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIÓN	51
LITERATURA CITADA DE CAPÍTULO III.	51
7. Discusión General	54
8. Conclusión General	56
9. Mecanismo de acción sugerido por <i>Callistemon citrinus</i> en la obesidad	57
10. Literatura Complementaria	59
11. Anexos	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas de <i>Callistemon citrinus</i> e inflorescencia.	13
Figura 2. Estrategia experimental llevada a cabo para realizar la presente investigación.	15
Figura 3. Imagen del modelo de inducción de obesidad con una dieta hipercalórica.	20
Figura 4. Peso corporal en ratas control y los diferentes tratamientos experimentales durante las 13 semanas.	22
Figura 5. Malondialdehído y 4-hidroxinonenal en el hígado del grupo control y los diferentes tratamientos.	33
Figura 6. Contenido de malondialdehído y 4-hidroxinonenal en el corazón del grupo control y los diferentes tratamientos.	34
Figura 7. Contenido de proteínas carboniladas en hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos.	35
Figura 8. Contenido de glutatión reducido en ratas control y los diferentes tratamientos experimentales en el hígado y corazón.	36
Figura 9. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales.	46
Figura 10. Actividad de la enzima catalasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales.	46
Figura 11. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales.	47
Figura 12. Actividad de la enzima paraoxonasa uno o arilesterasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales.	48
Figura 13. Actividad de la enzima glutatión s-transferasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales.	48
Figura 14. Esquema del posible mecanismo de acción del extracto etanólico de hojas de <i>C. citrinus</i> y sus fitoquímicos mayoritarios en condiciones de obesidad.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos aislados de plantas que presentan actividad anti-obesogénica.	11
Tabla 2. Parámetros morfométricos, indicadores de la obesidad en ratas y pesos de los órganos analizados.	23
Tabla 3. Análisis bioquímico de plasma en el grupo control y los diferentes grupos experimentales.	24

Resumen

Antecedentes: La obesidad es una condición global de riesgo para la salud, se asocia con el desarrollo de patologías como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 o trastornos metabólicos. En este estudio, investigamos el efecto del extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* sobre el estrés oxidativo causado por una dieta alta en grasas en ratas.

Métodos: Aleatoriamente 24 ratas Wistar se dividieron en 4 tratamientos de 6 ratas. El grupo 1 fue control, los grupos 2, 3 y 4 se alimentaron con una dieta alta en grasas, además, al grupo 3 se le administró simvastatina (3 mg/kg de peso corporal/oral diariamente) y al grupo 4 se le administró el extracto etanólico de hoja de *Callistemon citrinus* (250 mg/kg de peso corporal/oral diariamente) durante 13 semanas. A las 13 semanas del procedimiento experimental, se midieron los parámetros morfométricos y se tomó la sangre para obtener los parámetros bioquímicos. Al final de las 13 semanas, los animales fueron sacrificados con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (120 mg/kg de peso corporal). El hígado y el corazón se usaron para determinar las enzimas del sistema de defensa antioxidante, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), la enzima de detoxificación de la fase II glutatión S-transferasa (GST) y la enzima antioxidante-detoxificante paraoxonasa (PON1), además, el contenido de glutatión reducido (GSH), malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-alquenos (HNE) y proteínas carboniladas (PCO).

Resultados: Los resultados mostraron que las ratas tratadas con *Callistemon citrinus* tenían un peso corporal y parámetros morfométricos significativamente más bajos que el grupo alimentado con una dieta alta en grasas ($p > 0.05$). Además, las actividades de SOD, CAT, GPx, GST y PON1 fueron similares al grupo control. Con relación a los biomarcadores del estrés oxidativo (GSH, MDA, HNE y PCO) en los diferentes órganos se redujeron significativamente los niveles con respecto al grupo tratado con una dieta alta en grasas ($p \leq 0.05$).

Conclusiones: Este estudio sugiere que las hojas de *C. citrinus* podrían usarse como tratamiento o prevención de la obesidad, debido a la disminución del peso corporal y los efectos antioxidantes sobre el estrés oxidativo durante esta afección.

Palabras clave: Obesidad, Estrés oxidativo, *Callistemon citrinus*, Efecto anti-obesogénico, Antioxidante.

Abstract

Background: Obesity is a global health risk condition, it is associated with the development of pathologies such as some types of cancer, cardiovascular diseases, type 2 diabetes or metabolic disorders. In this study, we investigated the effect of ethanolic extract of *C. citrinus* leaves on oxidative stress caused by a high-fat diet in rats.

Methods: Randomly 24 Wistar rats were divided into 4 treatments of 6 rats. Group 1 was control, groups 2, 3 and 4 were fed a high fat diet, in addition, group 3 was given simvastatin (3 mg/kg body weight/oral daily) and group 4 was administered *Callistemon citrinus* ethanolic leaf extract (250 mg/kg body weight/oral daily) for 13 weeks. At 13 weeks of the experimental procedure, the morphometric parameters were measured and blood was taken to obtain the biochemical parameters. At the end of 13 weeks, the animals were sacrificed with an intraperitoneal sodium pentobarbital overdose (120 mg / kg body weight). The liver and heart were used to determine the antioxidant defense system enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), the detoxification enzyme of phase II glutathione S-transferase (GST) and the antioxidant-detoxifying enzyme paraoxonase (PON1), in addition, the content of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), 4-hydroxyalkenes (HNE) and carbonylated proteins (PCO).

Results: The results showed that the rats treated with *Callistemon citrinus* had a significantly lower body weight and morphometric parameters than the group fed a high-fat diet ($p > 0.05$). In addition, the activities of SOD, CAT, GPx, GST and PON1 were similar to the control group. Regarding the biomarkers of oxidative stress (GSH, MDA, HNE and PCO) in the different organs, the levels were significantly reduced with respect to the group treated with a high fat diet ($p \leq 0.05$).

Conclusions: This study suggests that *C. citrinus* leaves could be used as in the treatment or prevention of obesity, due to the decreases in the body weight and the antioxidant effects over the stress oxidative during this condition.

Keywords. Obesity, Oxidative stress, *Callistemon citrinus*, Effect anti-obesity, Antioxidant.

1. Introducción General

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), consisten en especies de oxígeno radicales y no radicales formadas por la reducción parcial de oxígeno. Dentro de las fuentes endógenas de ROS se encuentra la cadena transportadora de electrones mitocondrial como uno de los principales generadores de ROS y los peroxisomas que son una fuente importante de producción de H_2O_2 (Boveris *et al.*, 1972; Liu y Schubert, 2002; Ray *et al.*, 2012). También existen fuentes exógenas de ROS tales como la contaminación, alcohol, humo de tabaco, metales pesados, metales de transición, solventes industriales, pesticidas, ciertos fármacos y radiación (Phaniendra *et al.*, 2015). Las especies reactivas de oxígeno son necesarias para la vida humana, por lo que diversos eventos vitales están mediados por ROS en el organismo y sirven como moléculas de señalización en bajas concentraciones, pero si se producen en grandes cantidades generan efectos dañinos a las biomoléculas tales como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, alterando así el estado redox normal que conduce a un estrés oxidativo (Dhalla *et al.*, 2000; Phaniendra *et al.*, 2015), es decir, un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes a favor de los oxidantes (Sies, 1997). Durante el consumo de dietas hipercalóricas, la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de los ácidos grasos son vías metabólicas clave para la homeostasis energética en órganos como el hígado y el corazón, sin embargo, esta adaptación metabólica aumenta la producción de ROS e induce secundariamente el estrés oxidativo (Houten y Wanders, 2010; Begriche *et al.*, 2013), de esta manera, el aumento del consumo de grasas y azúcares y la falta de actividad física se han relacionado con la obesidad y ha sido considerada como un factor importante para causar diversos problemas de salud (Sikaris, 2004; Lastra *et al.*, 2006), estos cambios conducen promueve la generación excesiva de productos de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas, la disminución de los sistemas antioxidantes y los niveles reducidos de glutatión (GSH), de esta manera se comienza con el desarrollo de varias enfermedades crónicas, tales como diabetes y enfermedades cardiovasculares (Rani *et al.*, 2016).

El hecho de que a la obesidad causada por la mala alimentación se le considere un estado asociado al estrés oxidativo (Sikaris, 2004; Begriche *et al.*, 2013), es importante buscar plantas que tengan una capacidad antioxidante para combatirla. Las investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo han demostrado hallazgos importantes en los extractos de *C. citrinus* ya que contienen diversos fitoquímicos de interés farmacológico (Petronihlo *et al.*, 2013), además, los extractos de *Callistemon citrinus* en estudios de toxicidad aguda y crónica en ratas no han mostrado signos de toxicidad en ratas (López-Mejía *et al.*, 2016). En posteriores investigaciones se ha encontrado que las hojas de *Callistemon citrinus* tienen capacidad antioxidante contra el daño oxidativo ocasionado por un compuesto altamente carcinogénico (1,2-dimetilhidrazina), protegiendo el colon, hígado, riñones y el corazón en un modelo *in vivo* (Ortega-Pérez 2017; López-Mejía, 2018; Magaña-Rodríguez, 2018; López-Mejía *et al.*, 2019), por lo cual, *C. citrinus* es una excelente alternativa para el estudio de enfermedades ocasionadas por daños oxidativos. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del extracto de *Callistemon citrinus* sobre el estrés oxidativo en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

1.1. Sistemas antioxidantes, detoxificantes y radicales libres

El estrés oxidativo es la exposición de los seres vivos a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes (Venereo-Gutiérrez, 2002).

La importancia de los antioxidantes radica en el papel fisiológico que desempeñan, ya que los antioxidantes ayudan a prevenir algún daño de los componentes celulares como consecuencia de las reacciones químicas que implican a los radicales libres (Young y Woodside, 2001). Los radicales libres (RL) participan en funciones de diversos procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción y se producen por diferentes mecanismos, en los que se encuentra la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Chihuailaf *et al.*, 2002). Los RL son átomos, moléculas o iones con un electrón no apareado en su último nivel orbital y son altamente inestables y activos por lo que intervienen en reacciones químicas con biomoléculas. Se derivan

específicamente de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando así especies reactivas de oxígeno (ROS), nitrógeno y azufre (Carocho y Ferreira, 2013).

Las consecuencias del daño celular difieren y dependen del nivel y lugar de la generación de las ROS, eficiencia de los sistemas antioxidantes y los componentes celulares con los que interactúan (Lushchak, 2014). En circunstancias de estrés oxidativo se produce un daño en las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos principalmente, modificando su función y, por lo tanto, la formación excesiva de radicales libres en la célula puede llevar a una sobreexpresión de genes oncogénicos, generación de compuestos mutágenos, promoción de actividad aterogénica y aparición de placa senil o inflamación (Pisoschi y Pop, 2015). De esta forma, los RL están directamente involucrados en el daño celular y el envejecimiento, lo cual afecta una amplia variedad de funciones fisiológicas contribuyendo a la iniciación de enfermedades en distintos órganos, tales como: enfermedades cardiovasculares, cardiopatías, trombosis, cáncer, Parkinson, Alzheimer, aterosclerosis, hipertensión, cataratas, entre otras (Lachance *et al.*, 2001; Rathod *et al.*, 2016). La obesidad afecta a varios órganos en el cuerpo, como el hígado y el corazón, ya que en estos órganos se dan más complicaciones entre las personas obesas. El hígado graso es común en la obesidad, así como la aterosclerosis y las afectaciones cardíacas (Pi-Sunyer, 2002; Musaad y Haynes, 2007; Alaminos-Castillo *et al.*, 2019).

Las células cuentan con una serie de mecanismos enzimáticos de defensa, como son la enzima superóxido dismutasa, la catalasa y la enzima glutatión peroxidasa y sistemas de naturaleza no enzimática como el glutatión reducido, vitamina C y vitamina E presentes en el propio organismo, así como las que compuestos antioxidantes que provienen de la dieta (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las peroxidasa, y los eliminadores de radicales libres no enzimáticos (GSH) convierten las especies reactivas de oxígeno en agua y oxígeno, las moléculas estables. Se sabe que estos sistemas antioxidantes protegen las células y los tejidos contra el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (Uttara *et al.*, 2009). En la obesidad se incrementan las ROS, lo cual puede afectar a la actividad normal de la SOD, CAT y GPx (Noeman *et al.*, 2011).

Alternativamente, se sabe que varios sistemas enzimáticos oxidan, reducen o hidrolizan (reacción de fase 1) y luego conjugan o neutralizan de otro modo (reacción de fase 2) fármacos, metabolitos, carcinógenos y otros productos químicos tóxicos, aumentando así su polaridad y excretabilidad. De este modo a las enzimas de fase 2 se les relaciona con la detoxificación (Khanum *et al.*, 2004). La glutatión-S-transferasa (GST) es una enzima de fase 2 involucrada en el metabolismo de ROS y compuestos xenobióticos durante la obesidad (Schwartz *et al.*, 2005). La GST funciona con GSH como sustrato para estabilizar y descomponer las sustancias tóxicas y electrofílicas generadas en el organismo vivo (Kang *et al.*, 2010).

Por otro lado, en la obesidad se dan posibles eventos aterogénicos, por lo cual, la PON posee un papel destacado como enzima anti-aterogénica. La enzima paraoxonasa o arilesterasa (PON1) participa en regulación del estrés oxidativo, la paraoxonasa (PON) podría desempeñar un papel importante como antioxidante y detoxificante (Alaminos-Castillo *et al.*, 2019). Se sintetiza principalmente en el hígado y aparece principalmente en suero y está muy relacionada con las lipoproteínas de alta densidad, es una esterasa dependiente de calcio, la cual detoxifica los lípidos oxidados, esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en el hígado, corazón, riñón, intestino pequeño, cerebro y pulmones. La PON es multifuncional en diversas vías bioquímicas, ya que participa en la protección contra el daño oxidativo y la peroxidación lipídica; la contribución a la inmunidad innata; la desintoxicación de moléculas reactivas y la regulación de la proliferación y apoptosis celular (Ceron *et al.*, 2014; Alaminos-Castillo *et al.*, 2019).

Entonces las enzimas son biocatalizadores cruciales en el metabolismo. Por lo tanto, todas las sustancias tomadas en el cuerpo pueden interactuar con varias enzimas, especialmente algunas enzimas se denominan objetivo farmacológico (Demir *et al.*, 2016). De ahí que los antioxidantes se usan para minimizar muchas enfermedades y los antioxidantes son bien conocidos por actuar como reservas frente al estrés oxidativo. Sin embargo, las plantas incluyen varios compuestos naturales que pueden ser importantes para algunos trastornos de los seres vivos. Por lo tanto, el uso de extractos de plantas tiene un lugar importante en la medicina como agentes terapéuticos (Krishnaiah *et al.*, 2011).

1.2. Sobrepeso y obesidad

El tejido adiposo es el almacén de energía que tiene el cuerpo, sin embargo, el desbalance energético es una de las causas de la obesidad, ya que una cantidad excesiva de energía ocasiona que las células preadipocíticas se conviertan en adipocitos (hiperplasia) y la acumulación de triacilglicerol en los adipocitos maduros (hipertrofia) (Unger, 2003). La obesidad se define como la acumulación anormal o excesiva de grasa que presenta un riesgo para la salud (OMS, 2016). Una medida de obesidad en bruto es el índice de masa corporal (IMC), el peso de una persona (en kilogramos) dividido por el cuadrado de su altura (en metros). Una persona con un IMC de 30 o más generalmente se considera obeso. Una persona con un IMC igual o superior a 25 se considera con sobrepeso.

La obesidad fue alguna vez considerado un problema solo en los países económicamente desarrollados, el sobrepeso y la obesidad ahora están aumentando drásticamente en los países de ingresos bajos y medianos, particularmente en los entornos urbanos. Esta condición tiene niveles epidémicos a nivel mundial, razón por la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera la epidemia del siglo XXI. De hecho, el aumento excesivo de peso corporal desencadena una serie de enfermedades crónicas, por lo cual, es el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Cada año fallecen millones de adultos a consecuencia del sobrepeso o la obesidad, es por esto que la primera causa de muerte por el exceso de peso son las enfermedades cardiovasculares (cardiopatías y accidentes cerebrovasculares), seguido de la diabetes y, por último, riesgos de padecer algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) que son atribuidos a esta condición patológica (OMS, 2017).

La prevalencia a la obesidad ha aumentado a un ritmo alarmante, en la actualidad, el 65% de la población mundial tiene sobrepeso donde se estima que de 1975 al 2016, la obesidad casi se ha triplicado en todo el mundo, y para el 2016, más de 1.900 millones de personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso (el 39%), de los cuales, más de 650 millones eran obesos (13%), y sobre el número de niños con obesidad o sobrepeso menores de cinco años superan los 41 millones (OMS, 2016).

De acuerdo al informe anual por la UNICEF en 2017, México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil (con el 33% de población infantil en México, lo que indica que 1 de cada 3 niños tienen esta condición), de acuerdo a datos más actualizados del INEGI en el 2018, uno de cada 20 infantes menores de 5 años y uno de cada 3 entre los 6 y 19 años tiene sobrepeso u obesidad, cifras que siguen posicionando a México entre los primeros lugares en obesidad infantil a nivel mundial, problema que se presenta más a menudo en los estados del norte (Baja California Norte y Baja California Sur) y en comunidades urbanas con el 39.7% y en menor proporción en estados del sur del país (Oaxaca y Chiapas) en comunidades rurales con el 34.6%. Con respecto a los adultos, los resultados de la ENSANUT MC de 2016 indican que México es el segundo lugar mundial en personas adultas con 7 de cada 10 adultos (72.6% de población adulta en México) de ellos tienen sobrepeso u obesidad. Esta prevalencia es mayor en mujeres que en hombres y es similar entre los grupos de 30 a 79 años de edad. En la última encuesta del 2018 del INEGI en colaboración con la ENSANUT, la cifra de personas con sobrepeso y obesidad aumento en adultos a un porcentaje de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad) en donde la mayor prevalencia en sobrepeso es para hombres y en obesidad para mujeres.

1.2.1. Modelos de inducción de obesidad con dietas hipercalóricas

Dado que la falta de informes es un sesgo importante en los estudios epidemiológicos sobre la dieta y la obesidad en seres humanos (Voss *et al.*, 1998; Hebert *et al.*, 2003), los modelos animales se han utilizado ampliamente para tener una mejor comprensión sobre la obesidad alimentaria. Los efectos de la dieta dependen no solo de la composición de la dieta, sino también del tipo y la cepa del roedor. Por lo que las ratas tienen algunas ventajas sobre los ratones y esto se debe a su mayor tamaño (por ejemplo, técnicas de catéter, extracción de sangre, etc.), además, la gran cantidad de estudios realizados en obesidad en ratas, principalmente en ratas Wistar y Sprague-Dawley las convierte en los roedores estándar para este tipo de experimento (Reuter, 2007; Young y Kirkland, 2007; Hariri y Thibault, 2010; Román *et al.*, 2013). Con respecto a la dieta para inducir obesidad, se han usado diferentes dietas con fracciones de grasa relativas entre 20% y 60% de energía como grasa, y el componente básico de grasa varía entre las grasas derivadas

de animales, por ejemplo, manteca de cerdo o sebo de vaca, y aceites vegetales de maíz o aceite de cártamo, también se han empleado dietas bien definidas y semipurificadas, en las cuales el componente de grasa reemplaza a los carbohidratos y proteínas, y en el caso más sencillo simplemente se ha agregado grasa a un alimento estándar para roedores (Buettner *et al.*, 2007; Román *et al.*, 2013). La variedad de dietas ricas en grasas en los modelos de obesidad en ratas ha contribuido significativamente al análisis de las patologías asociadas a este padecimiento, de igual importancia estas dietas tienen diferentes efectos metabólicos y moleculares (Buettner *et al.*, 2006).

Algunos estudios han informado que no todas las grasas son obesogénicas y que el perfil de ácidos grasos en la dieta en lugar de la cantidad de energía de las grasas es una variable importante en el desarrollo de la obesidad en la dieta (DeLany *et al.*, 2000; Storlien *et al.*, 2001; Ghibaudi *et al.*, 2002; Kien *et al.*, 2005).

En los modelos animales, la obesidad puede evaluarse mediante varios criterios, los cuales son el aumento de peso corporal, el aumento del contenido de grasa corporal y el índice de Lee para evaluar la obesidad en ratas que es similar al IMC en humanos (valores superiores a 0.31 en el índice Lee es un indicador de obesidad). En la mayoría de los estudios, el grado de obesidad se ha evaluado comparando el peso corporal del grupo experimental alimentado con una dieta alta en grasas o con alto contenido energético con animales control que muestran un crecimiento normal mientras se alimentan con dieta estándar o baja en grasas (Ghibaudi *et al.*, 2002; Levin y Dunn-Meynell, 2002; Woods *et al.*, 2003; Novelli *et al.*, 2007). Las investigaciones previas han determinado que la diferencia del peso corporal de las ratas control (grupo normal) contra el grupo experimental (grupo obeso) en un rango del 10% al 25% es obesidad moderada y mayor del 40% como obesidad severa (Levin y Dunn-Meynell, 2002; Woods *et al.*, 2003).

1.2.2. Uso de estatinas durante el sobrepeso y la obesidad

La HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa) produce mevalonato y es la principal enzima para la biosíntesis de colesterol en el hígado, inhibida de manera competitiva y reversible por las estatinas a través de su anillo de lactona y cadenas laterales que las ayudan a unirse al sitio activo de la enzima (Sirtori, 2014). Dado que el

mevalonato, producto de la reacción HMG CoA reductasa, es el precursor no solo del colesterol, sino también de muchos otros compuestos isoprenoides no esteroideos, la inhibición de esta enzima clave puede dar lugar a efectos pleiotrópicos que se han dividido en dos tipos, que incluyen: lípidos directos o vías de señalización intracelular (Bellosta *et al.*, 2000).

El tejido adiposo también es un productor de péptidos hormonales, llamados adipocitocinas. La producción y secreción de estas moléculas son reguladas por factores nutricionales y ambientales, dentro de estas se encuentra la leptina, adiponectina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Domínguez, 2007). Las estatinas son agentes hipolipemiantes que reducen la acumulación de macrófagos en las placas ateroscleróticas y los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF y IL-6) en individuos hipercolesterolémicos (Rosenson *et al.*, 1999).

A medida que las estatinas se volvieron más utilizados en un mayor número de pacientes con obesidad, comenzaron a surgir sus efectos más allá de la disminución de los lípidos. Tales efectos pleiotrópicos incluyen la mejora de la disfunción endotelial, el aumento de la biodisponibilidad del óxido nítrico, los efectos antioxidantes, las propiedades antiinflamatorias y la estabilización de las placas ateroscleróticas. Las investigaciones indican que algunos de los efectos pleiotrópicos de las estatinas pueden no estar relacionados con las propiedades reductoras del colesterol de los fármacos. Otros incluso pueden estar completamente disociados de la inhibición de HMG-CoA reductasa, y muchos tienen lugar a concentraciones de fármaco muy bajas. Comprender el espectro completo de beneficios asociados con la terapia con estatinas puede permitir una mejor aplicación terapéutica y fomentar el uso temprano de estatinas en los síndromes coronarios agudos (Davignon, 2004).

Algunas de las estatinas se obtienen después de la fermentación fúngica: lovastatina, pravastatina y simvastatina, otras por síntesis: fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina (Stancu y Sima, 2001), las estatinas tienen el hígado como órgano diana (Blum, 1994). Por las características ya mencionadas de las estatinas es que se emplean en estudios de obesidad en ratas como grupo estándar ya que la administración de este compuesto disminuye el perfil lipídico durante la obesidad como lo demuestra el estudio de Bais *et*

al., (2014) que utilizó simvastatina a una concentración de 3mg/kg de peso y el de Mnafgui *et al.*, (2015) que administró fluvastatin a una concentración de 2 mg/kg.

Asimismo, Las estatinas son una clase de medicamentos ampliamente recetados desarrollados originalmente por sus propiedades hipolipemiantes, pero también tienen una importante actividad antioxidante (Haendeler *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las estatinas pueden tener la capacidad de atenuar el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia mediante la inhibición de la NADPH oxidasa vascular (Tsubouchi *et al.*, 2005), estimular los mecanismos de defensa enzimáticos (SOD, CAT, GPx, PON) y no enzimáticos (GSH) frente al estrés oxidativo (Costa *et al.*, 2016), disminuyen la producción de superóxido (Sanguigni *et al.*, 2002) y reducen los marcadores de estrés oxidativo (Li *et al.*, 2002).

1.3. Plantas medicinales, capacidad antioxidante y protectora

Los metabolitos secundarios de las plantas, también denominados productos naturales o metabolitos especializados, constituyen una amplia reserva de la biodiversidad química, ya que más de 200.000 estructuras químicas diferentes han sido identificadas (Buchanan, 2015). Los metabolitos secundarios se forman a través de vías especializadas que comienzan con los metabolitos primarios. Los metabolitos primarios, por el contrario, tienen una amplia distribución en todos los seres vivos y están íntimamente involucrados en procesos vitales esenciales, asimismo, los metabolitos secundarios son importantes para el organismo que los produce, en este caso para la planta (Herbert, 1989). La capacidad de sintetizar metabolitos secundarios ha ido respondiendo evolutivamente a necesidades específicas como suprimir el crecimiento de plantas vecinas, para evitar patógenos y herbívoros, atraer polinizadores, o para funciones celulares que son únicas para la planta como tolerancia a sequías o incluso algún compuesto químico (Pichersky y Gang, 2000). Estos compuestos naturales se pueden dividir en cuatro clases principales: los terpenoides, los fenilpropanoides, los glicósidos y los alcaloides (García y Carril, 2011).

En el área de la fitoquímica las plantas medicinales han centrado especial interés, ya que son aquellas plantas que sintetizan compuestos llamados principios bioactivos o también conocidos como principios activos, que son compuestos que desempeñan funciones

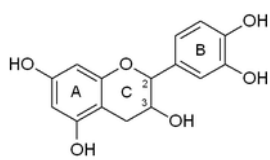

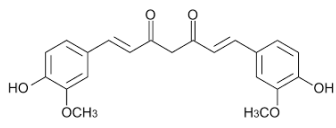

farmacológicas, beneficiosas o perjudiciales, sobre el organismo vivo que consume o es administrado con alguna planta medicinal. La utilidad de estos compuestos es de gran importancia, ya que pueden servir como suplementos o medicamentos que alivien la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que pueden neutralizar o disminuir el desequilibrio orgánico de una enfermedad. Las plantas medicinales se han caracterizado por sus posibles compuestos bioactivos, que han sido separados y sometidos a ensayos detallados de la bioactividad, identificación de potenciales modos de acción y sitios diana de estos compuestos (Estrella, 1995; Briskin, 2000). Actualmente, un gran número de compuestos bioactivos con propiedades medicinales son aislados de plantas, de ahí la relevancia de buscar compuestos con propiedades biológicas para ser utilizados en el desarrollo de nuevos medicamentos o aditivos alimentarios para generar protección frente a diferentes enfermedades (Arredondo-Espinoza, 2011).

Igualmente, existen elementos minerales mayoritarios y trazas presentes en las plantas medicinales que cumplen diversas funciones en el organismo vivo, entre ellas como electrolitos, constituyentes de enzimas, materiales estructurales de huesos y dientes, entre otras funciones, ya sea que se consuman como bebida, alimento, productos nutracéuticos o cualquier otra forma (Martínez, 2016). El efecto protector de las plantas es debido a la presencia de antioxidantes naturales como los compuestos fenólicos y vitaminas, por esa razón, los compuestos presentes naturalmente en las plantas comestibles y medicinales con capacidad de estimular los sistemas antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos se consideran benéficas (Ramos-Gomez *et al.*, 2011).

El esfuerzo de muchas comunidades científicas se ha centrado en el descubrimiento de productos naturales como posibles fármacos contra la obesidad debido a la alta eficacia de los fitoquímicos en la regulación de los efectos bioquímicos y moleculares durante la obesidad para disminuir la absorción y el almacenamiento de grasas, además de la atenuación en el estrés oxidativo en esta condición es una alternativa medicinal. Los compuestos bioactivos de las plantas, poseen efectos contra la obesidad a través de numerosos mecanismos, como la inhibición enzimática de la lipasas digestivas y metabólicas, la supresión del apetito, el aumento de la termogénesis y la inhibición de la proliferación y diferenciación de pre-adipocitos (Yun, 2010; Mohamed *et al.*, 2014; Sun *et*

al., 2016). Se han publicado varios informes sobre el efecto anti-obesogénico de los extractos de plantas en modelos animales de obesidad (Bais *et al.*, 2014; Mnafigui *et al.*, 2015; Jambocus *et al.*, 2017).

Tabla 1. Compuestos aislados de plantas que presentan actividad anti-obesogénica.

Compuesto	Planta	Actividad anti-obesogénica
<p>Catequinas</p> 	 <p><i>Camellia sinensis</i></p>	<p>Inhibidor de la lipasa pancreática (Cha <i>et al.</i>, 2012).</p> <p>Supresores del apetito (Moon <i>et al.</i>, 2007)</p>
<p>Curcumina</p> 	 <p><i>Curcuma longa</i></p>	<p>Reduce la formación de tejido adiposo (Ejaz <i>et al.</i>, 2009).</p> <p>Previene la acumulación de lípidos (Pongchaidecha <i>et al.</i>, 2009).</p>

1.4. *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels

Los efectos potenciales de los extractos de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels *in vitro* sugieren promover la protección de la salud durante la obesidad como se ha informado previamente (Ahmed y Rahman, 2016; Sampath *et al.*, 2016; Sampath *et al.*, 2017; Fayemi *et al.*, 2019). *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (syn. *Callistemon lanceolatus*), también conocido como "Bottlebrush" o "escobillón" pertenece a la familia Myrtaceae, planta arbustiva nativa de Australia y ampliamente cultivada en lugares tropicales, pero en México solo crece como árbol ornamental (Goyal *et al.*, 2012; Ríos-Chávez *et al.*, 2019). Además, se han documentado varios propósitos etnofarmacológicos de *C. citrinus* para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, enfermedades infecciosas y dolor

(Sudhakar *et al.*, 2004; Goyal *et al.*, 2012) y los aborígenes australianos lo usaron como alimento tradicional (Radulović *et al.*, 2015).

Los extractos de *Callistemon citrinus* están asociados con muchas propiedades promotoras de la salud (Sumitra, 2014). Actualmente se han reportado propiedades fitoterapéuticas benéficas en *C. citrinus*, tales como propiedades anticancerígenas contra el cáncer de mama (Ahmed *et al.*, 2019) y colon (López-Mejía *et al.*, 2019), así como actividad cardioprotectora, renoprotectora y hepatoprotectora durante el cáncer de colon (Ortega-Pérez, 2017; Rodríguez-Magaña, 2018). También se ha reportado actividad anti-glucosidasa (Fayemi *et al.*, 2019), antiinflamatorio (Radulović *et al.*, 2015), para proteger contra la diabetes tipo 2 (Kumar *et al.*, 2011; Nazreen *et al.*, 2012) y como antioxidante (Haque *et al.*, 2012). Estas propiedades medicinales de *C. citrinus* han sido atribuidas principalmente a los compuestos fenólicos y terpenoides reportados previamente (Petronilho *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2019; Ríos-Chávez *et al.*, 2019) con varios compuestos bioactivos que incluyen 1,8-cineol, limoneno, linalool, mirceno, fitol, pineno, espatulenol, terpineol y terpinoleno (Shukla *et al.*, 2012; Petronilho *et al.*, 2013; Sampath *et al.*, 2017). Sin embargo, todavía no existen evidencias científicas del posible efecto de las hojas de *C. citrinus* (Curtis) Skeels sobre el estrés oxidativo en la obesidad en un modelo *in vivo*.

1.4.1. Características de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels

Es una planta arbustiva de 2-6 metros de altura, sus hojas son lanceoladas, planas y coriáceas, desarrolla inflorescencias con pétalos de color verdosos, diminutos, discretos y en algunos casos caducifolios, además tienen prominentes estambres rojos que son llevados en espigas de unos 40-150 mm de largo (fig. 1), El fruto es una cápsula pequeña de textura leñosa (Australian National Botanic Gardens, 2012; Greig, 1999; Montañón-Ñeco, 2011; Perry y Hay, 1982). *C. citrinus* primero fue descrita por Curtis en 1794 y posteriormente Skeels realizó algunas modificaciones en 1913, su clasificación científica actual es la siguiente (Missouri Botanical Garden, 2013):

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta

- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Myrtales
- Familia: Myrtaceae
- Género: *Callistemon*
- Especie: *C. citrinus* (Curtis) Skeels.



Figura 1. Hojas de *Callistemon citrinus* (imagen izquierda) e inflorescencia (imagen derecha) (Fuente: Elaboración propia).

2. Justificación

Es importante encontrar una planta que tenga un efecto sobre el daño ocasionado por las especies reactivas en el organismo durante la obesidad inducida por una dieta hipercalórica para poder ser usada como un suplemento. Debido a que la obesidad se caracteriza por un incremento permanente de estrés oxidativo, lo cual produce las complicaciones relacionadas a la obesidad. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo demostrar que el extracto de la hoja de *Callistemon citrinus* al tener una alta capacidad antioxidante, altos niveles de fenoles y flavonoides podría ser usada para prevenir los daños ocasionados del estrés oxidativo en la obesidad por una dieta hipercalórica.

3. Hipótesis

El extracto de hoja de *C. citrinus* tiene capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo en la obesidad en rata.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto del extracto etanólico de hoja de *Callistemon citrinus* sobre el estrés oxidativo en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre los parámetros morfométricos en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.
2. Analizar el efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre los parámetros bioquímicos en las ratas en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.
3. Cuantificar el efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre los marcadores del estrés oxidativo en el hígado y corazón en las ratas obesas con una dieta hipercalórica.
4. Evaluar el efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre las actividades de las enzimas antioxidantes y detoxificantes en el hígado y corazón en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

5. Estrategia Experimental

Para cumplir con los objetivos de la investigación, la estrategia consistió en la colecta y preparación del extracto de hoja de *Callistemon citrinus*, después se implementó el modelo *in vivo* de obesidad por medio de una dieta hipercalórica, donde se administró el extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* durante trece semanas, posteriormente al termino de las trece semanas se midieron los parámetros morfométricos y bioquímicos en las ratas para determinar el efecto que tuvo *C. citrinus* en estas mediciones. Finalmente se llevó a cabo los análisis de las actividades enzimáticas en el hígado y corazón, así como la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativos en los tejidos de interés. La metodología completa se explica en la figura 2.

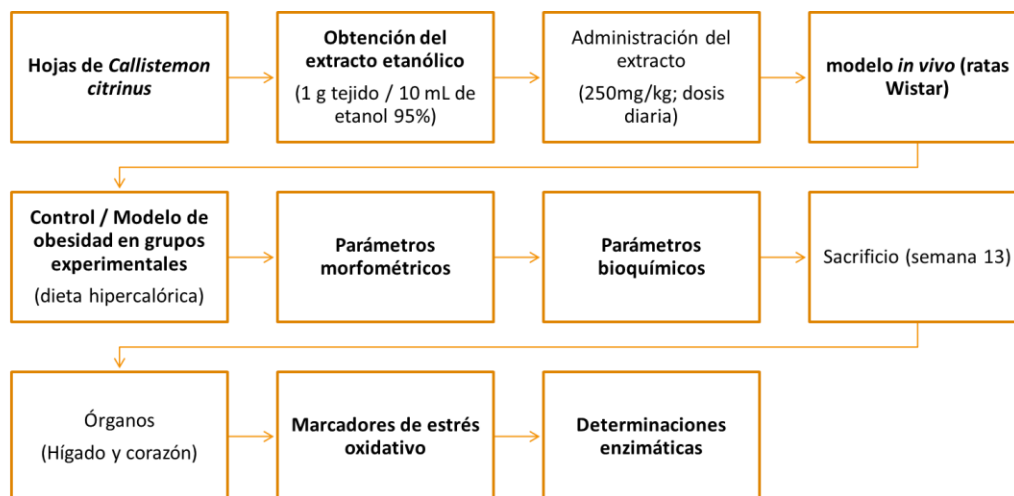


Figura 2. Estrategia experimental llevada a cabo para realizar la presente investigación.

6. Resultados

6.1. Capítulo I.

Efecto del extracto de hoja de *C. citrinus* sobre los parámetros morfométricos y bioquímicos en las ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

RESUMEN

En el presente estudio se investigó el efecto del extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* sobre los parámetros morfométricos y bioquímicos en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica. Aleatoriamente 24 ratas Wistar se dividieron en 4 tratamientos de 6 ratas. El grupo 1 fue control, los grupos 2, 3 y 4 se alimentaron con una dieta alta en grasas, además, el grupo 3 se administró con simvastatina (3 mg/kg de peso corporal/oral diariamente) y el grupo 4 se administró con extracto de hoja de *Callistemon citrinus* (250 mg/kg de peso corporal/oral diariamente) durante 13 semanas. A las 13 semanas del procedimiento experimental, se midieron los parámetros morfométricos y se tomó la sangre para obtener los parámetros bioquímicos. Los resultados mostraron que las ratas tratadas con *Callistemon citrinus* tenían un peso corporal y parámetros morfométricos significativamente más bajos que el grupo alimentado con una dieta alta en grasas ($p > 0.05$). Este estudio sugiere que las hojas de *C. citrinus* podrían usarse como agente terapéutico contra la obesidad, debido a la disminución del peso corporal.

Palabras clave: Obesidad, morfometría, parámetros bioquímicos, efecto anti-obesogénico, *Callistemon citrinus*.

ABSTRACT

In the present study, the effect of the ethanolic extract of *C. citrinus* leaves on morphometric and biochemical parameters in rats fed a hypercaloric diet was investigated. Randomly 24 Wistar rats were divided into 4 treatments of 6 rats. Group 1 was control, groups 2, 3 and 4 were fed a high fat diet, in addition, group 3 was administered with simvastatin (3 mg/kg body weight/oral daily) and group 4 was administered with *Callistemon citrinus* leaf extract (250 mg/kg body weight/oral daily) for 13 weeks. At the 13 weeks of the experimental procedure, the morphometric parameters were measured and blood was taken to obtain the biochemical parameters. The results

showed that the rats treated with *Callistemon citrinus* had a significantly lower body weight and morphometric parameters than the group fed a high-fat diet ($p > 0.05$). This study suggests that the leaves of *C. citrinus* could be used as a therapeutic agent against obesity, due to help the decrease in body weight.

Keywords: Obesity, morphometry, biochemical parameters, anti-obesogenic effect, *Callistemon citrinus*.

INTRODUCCIÓN

La obesidad se ha convertido en un grave problema de salud y genera diversos padecimientos que afectan a la población; en primer lugar, es una enfermedad crónica, multifactorial que produce alteraciones en el metabolismo de lípidos, en la presión arterial, afecta la coagulación, causa fibrinólisis e inflamación y sensibilidad a la insulina; de igual forma, es un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades, de las cuales las enfermedades metabólicas y cardiovasculares, gastrointestinales. Por lo tanto, puede ocasionar dislipidemias, enfermedades cardíacas, hígado graso, hipertensión, carcinogénesis y diabetes tipo-2 (Amancio-Chassin *et al.*, 2007; Tung *et al.*, 2017).

Los modelos biológicos de dietas hipercalóricas en el estudio del sobrepeso y la obesidad desempeñan un papel muy importante en la prevención y tratamiento de estos padecimientos (Von-Diemen *et al.*, 2006). De acuerdo con las recomendaciones de AIN-93M (American Institute of Nutrition, 1993), el consumo diario de lípidos para ratas adultas debe ser del 4%. El modelo dietético empleado en este estudio fue una dieta alta en grasas que contenía 37% de grasas saturadas, siendo esta concentración 9.25 veces más alta que la recomendada.

Los extractos etanólicos de hojas de *C. citrinus* tienen compuestos terpénicos, siendo el 1,8-cineol el más abundante, además, tiene un contenido importante de fenoles y flavonoides que presenta una importante capacidad antioxidante (López-Mejía, 2018). Los efectos benéficos de los extractos de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels *in vitro* sugieren tener efectos anti-obesogénicos como se ha informado previamente (Ahmed y Rahman, 2016; Sampath *et al.*, 2016; Sampath *et al.*, 2017; Fayemi *et al.*, 2019). En el presente capítulo se analiza y discute el efecto de la administración del extracto etanólico

de hojas de *C. citrinus* sobre los parámetros morfométricos y bioquímicos en ratas obesas.

METODOLOGÍA

Colecta del material biológico y preparación del extracto de hoja

Las hojas de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels de plantas adultas fueron colectadas en el mes de febrero del 2018 ubicadas sobre la Avenida Villa Universidad, calle localizada a uno de los costados de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) en la ciudad de Morelia, Michoacán, México. Se realizó la identificación por la M.C. Patricia Silva del Herbario del Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) y se depositó un duplicado de la planta bajo la referencia EBUM23538.

Las hojas frescas se maceraron en una proporción de 1:10 (1 g de tejido vegetal en 10 mL de etanol al 96%) y el extracto se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente los extractos de la hoja se llevaron a sequedad utilizando un rotavapor a una temperatura de 45°C. El extracto concentrado de la hoja se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su posterior utilización.

Animales

Se utilizaron ratas albino Wistar macho que fueron criadas y mantenidas en condiciones estándar: en un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 h, humedad relativa 60-70 %, temperatura promedio de 20°C, con libre acceso de agua y alimento balanceado (Rodent diet®) *ad-libitum*. Los animales pesaron entre 200-250 g con 8 semanas de edad al comienzo del experimento y se alojaron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Toda la atención de los animales durante el procedimiento experimental se realizó de acuerdo con el Reglamento Federal para el cuidado y uso de animales de laboratorio emitido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) del Ministerio de Agricultura de México. Esta investigación también fue aprobada por el comité de bioética para el uso de animales de laboratorio de la UMSNH.

Modelo de dieta hipercalórica

Se empleó una dieta hipercalórica anteriormente usada por García-Berumen *et al.*, (2019) con ligeras modificaciones. Las ratas fueron alimentadas con una dieta que contenía 63% de alimento normal (comida de rata marca *Rodent diet*®), 18.5% de manteca de cerdo y 18.5% de grasa vegetal de maíz, con fructosa al 25%. Se hizo esta dieta cada semana y se almaceno a -20°C.

Los animales fueron divididos de manera aleatoria en cuatro grupos (con n = 6 por grupo): grupo control, grupo dieta hipercalórica (DH), grupo DH más simvastatina (simv) y un grupo DH administrado con el extracto de hoja de *C. citrinus*, todos los grupos tuvieron libre acceso al agua.

Grupo I (Control): sirvió como grupo normal que fue alimentado con comida de rata (comida estándar o pellet *Rodent diet*®) *ad-libitum* durante 13 semanas.

Grupo II (DH): representó el control negativo en el cual los animales recibieron la DH preparada *ad-libitum* por 13 semanas.

Grupo III (DH + simv): control estándar en el que las ratas recibieron la DH *ad libitum* más simvastatina (3 mg/kg) administrada diariamente de manera oral con cánula durante 13 semanas. La dosis de simvastatina se seleccionó con base al informe previo de Bais *et al.*, (2014).

Grupo IV (DH + hoja): Recibieron la DH *ad libitum* y adicionalmente la administración diaria del extracto de hojas de *C. citrinus* 250 (mg/kg) de manera oral con cánula durante 13 semanas. La dosis de extracto de hojas de *C. citrinus* se seleccionó con base a nuestros estudios previos del efecto hepatoprotector de *C. citrinus* (Lopez-Mejia *et al.*, 2016) y el efecto quimiopreventivo de *C. citrinus* contra el cáncer de colon (Lopez-Mejia *et al.*, 2019).

El peso de todos los grupos se midió semanalmente. La duración total del experimento fue de 13 semanas. Después las ratas fueron sacrificadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (120 mg/Kg).

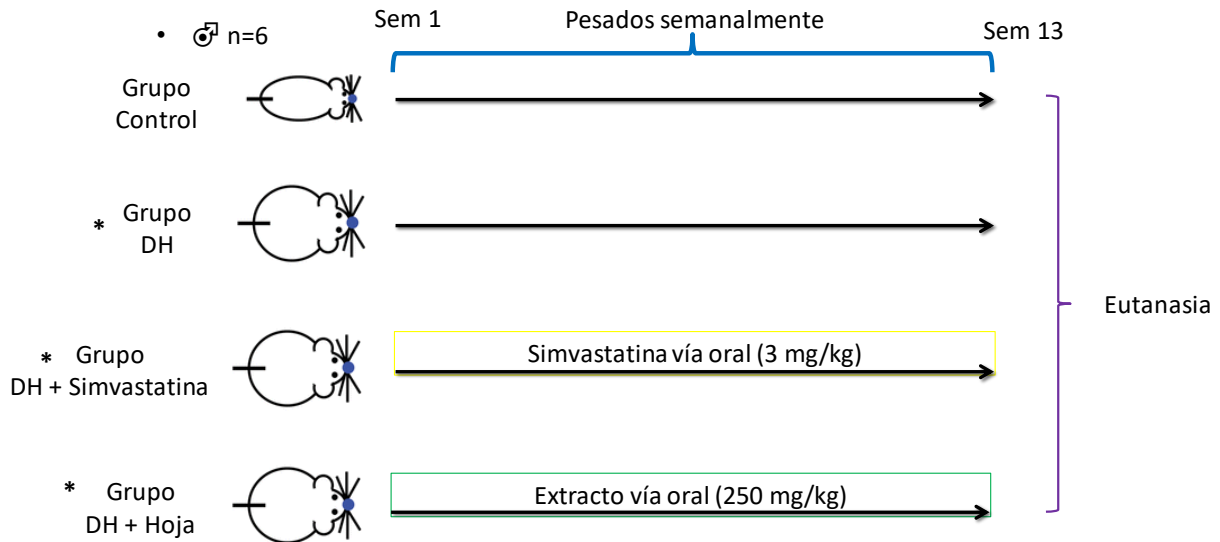


Figura 3. Imagen del modelo de inducción de obesidad con una dieta hipercalórica (DH). Se utilizaron 4 tratamientos con 6 ratas cada grupo, Grupo uno fue control, y los grupos dos, tres y cuatro se les dio la DH. Los tratamientos 3 y 4 se les dio adicionalmente simvastatina (3 mg/kg) y extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* (250 mg/kg) respectivamente. El experimento duró 13 semanas.

Medición de parámetros morfométricos y bioquímicos

Al final de 13 semanas de procedimiento experimental, se midieron los parámetros morfométricos y se recogió la sangre para obtener el suero en el que se determinaron los parámetros bioquímicos, después de las mediciones, los animales se sacrificaron usando una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (120 mg/kg). El suero se centrifugó (3000 rpm, 20 min, 4°C), el tejido adiposo total, el hígado y el corazón se extrajeron y pesaron. Los tejidos y el suero se almacenaron a -20°C hasta que se realizaron posteriores análisis.

Se tomaron los siguientes parámetros morfométricos, peso corporal total (BW) con báscula electrónica, longitud de nariz-ano (NAL) y longitud de nariz a cola usando una cinta métrica. Para determinar el índice de adiposidad (AI) que es una medida del grado

de grasa corporal que tiende a aumentar gradualmente con la obesidad, se calculó como $AI = (\text{peso total del tejido adiposo} / \text{peso corporal final}) * 100$. Además, El índice de masa corporal (IMC) ($IMC = Kg / m^2$). En ratas, el índice de Lee (LI) es similar al IMC en humanos, y se calculó con la ecuación $LI = [(3\sqrt{BW}) / NAL] * 10$. La ganancia de peso ganado (D) se calculó en el cambio de BW (%) con la ecuación $D = [(BW \text{ final} - BW \text{ inicial}) / BW \text{ inicial}] * 100$. Se calculó según lo determinado (Novelli *et al.*, 2007). Los niveles de los parámetros bioquímicos (triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, VLDL, glucosa, SGOT y SGPT) se realizaron en un espectrofotómetro utilizando kits comerciales de métodos enzimáticos colorimétricos (SPINREACT®). La proteína en suero se midió como con el método de Bradford (1976) usando BSA como el estándar de proteína en espectrofotómetro.

Análisis estadístico

Los seis animales se incluyeron en los tratamientos y los valores se expresaron como media \pm error estándar (SEM) o desviación estándar (SD). Los datos se analizaron utilizando JMP versión 8.0 mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y para determinar las diferencias estadísticas para el peso de los animales se utilizó la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples entre el control y los grupos experimentales. Para los parámetros morfométricos y bioquímicos entre los grupos de control y tratados, se siguió la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se consideró que los valores eran indicativos de significancia estadística $*P \leq 0.05$. Los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism versión 8.0.

RESULTADOS

En este estudio se utilizó un modelo de obesidad inducida por una dieta hipercalórica en ratas que es reproducible en varios experimentos, está bien controlado y comparte muchas características con la obesidad humana. Como efecto de la dieta empleada las ratas DH pesaron más que los controles, de igual manera, el grupo DH + simvastatina y DH + hoja mantuvieron un peso similar al grupo control a pesar de la dieta modificada, por lo cual estos dos grupos mantuvieron este peso ante los cambios en la disponibilidad

de energía. El estado de obesidad se reflejó como un aumento moderado y significativo a partir de la semana 6 del experimento en el peso corporal total.

Como se muestra en la fig. 4, las ratas que fueron alimentadas con una dieta alta en grasas durante 13 semanas mostraron un aumento significativo del peso corporal a partir de la sexta semana (15.5%) hasta la decimotercera semana (18%) en comparación con el grupo control. Los grupos tratados con simvastatina y *C. citrinus* en todas las semanas mantuvieron el peso similar al control. En realidad, la simvastatina y el extracto de hojas de *C. citrinus* en ratas alimentadas con DH atenuó significativamente el aumento de peso inducido por la DH, en un 14,6% y 22% respectivamente ($P \leq 0.05$), en la última semana. Estos resultados mostraron que *C. citrinus* (250 mg/b.w./diariamente) inhibió el aumento de peso a diferencia de las ratas tratadas únicamente con la DH.

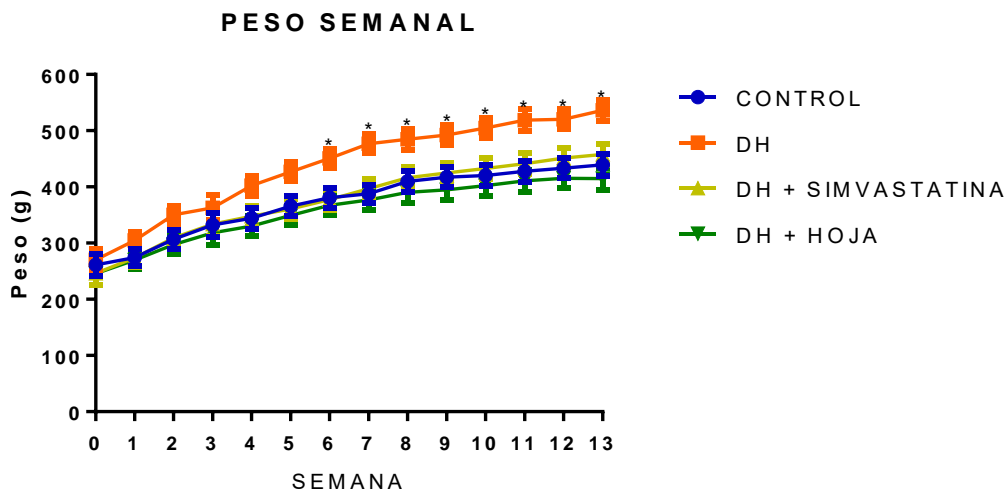


Figura 4. Peso corporal en ratas control y los diferentes tratamientos experimentales durante las 13 semanas. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=6$).

La tabla 2 muestra los parámetros morfométricos en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas al final de las 13 semanas, que indican que se observó una condición notable de obesidad para el tratamiento DH. El grupo de DH tuvo incrementos significativos en la circunferencia abdominal (14.37%), aumento de peso corporal (casi 50%), IMC (26.37%), índice de adiposidad (66%) e índice Lee (12.12%) con respecto al control. Sin embargo,

la hoja de *C. citrinus* decremento los parámetros biométricos que indicaban reducciones significativas en la circunferencia abdominal (12.21%), aumento de peso corporal (40.44%), IMC (24.17%), índice de adiposidad (27.63%) e índice de Lee (9.09%) respectivamente ($P \leq 0.05$) en comparación con el grupo DH. Se observaron resultados similares a los mencionados en el grupo tratado con *C. citrinus* en ratas con DH más simvastatina. En el caso del hígado y el corazón en los grupos experimentales no mostraron cambios relacionados como la apariencia externa y el peso de los órganos en comparación con el grupo control.

Tabla 2. Parámetros morfométricos, indicadores de la obesidad en ratas y pesos de los órganos analizados.				
Parámetros morfométricos	CONTROL	DH	DH + SIMVASTATINA	HFD + HOJA
Circunferencia abdominal (cm)	19.83 ± 1.60 ^b	23.16 ± 1.16 ^a	20.50 ± 1.37 ^b	20.33 ± 1.36 ^b
Longitud nariz-ano (cm)	25.41 ± 1.20 ^a	24.33 ± 1.50 ^a	25.41 ± 0.66 ^a	24.41 ± 0.91 ^a
Longitud nariz-cola (cm)	45.33 ± 1.86 ^a	45.16 ± 3.32 ^a	45.50 ± 0.89 ^a	44.66 ± 1.63 ^a
IMC (Kg/m ²)	0.67 ± 0.02 ^b	0.91 ± 0.12 ^a	0.68 ± 0.03 ^b	0.69 ± 0.09 ^b
Ganancia de peso corporal	63.47 ± 30.37 ^b	117.53 ± 17.88 ^a	90.75 ± 19.40 ^{a,b}	70.00 ± 17.64 ^b
Índice de adiposidad	2.90 ± 0.60 ^c	8.54 ± 1.84 ^a	4.57 ± 1.15 ^{b,c}	6.18 ± 0.39 ^b
Índice Lee	0.29 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.02 ^a	0.30 ± 0.01 ^b	0.30 ± 0.01 ^b
Peso de hígado (g)	14.56 ± 3.33 ^a	15.89 ± 2.86 ^a	15.98 ± 1.72 ^a	12.04 ± 3.19 ^a
Peso de corazón (g)	1.56 ± 0.43 ^a	1.39 ± 0.18 ^a	1.34 ± 0.22 ^a	1.13 ± 0.20 ^a
Los valores son expresados como la media ± SD (n=6, ANOVA seguido de Tukey, valores estadísticamente diferentes (^{a, b, c}) entre grupos ($P \leq 0.05$).				

Como se muestra en la tabla 3, los tres tratamientos que se alimentaron con una dieta alta en grasas, no presentaron cambios significativos en los parámetros como triacilglicéridos, colesterol total, colesterol (HDL, LDL y VLDL), glucosa, proteínas totales, albúmina y las actividades enzimáticas de la transaminasa glutámico-oxaloacética (SGOT) y transaminasa glutámico pirúvica (SGPT) en comparación con el grupo control.

Tabla 3. Análisis bioquímico de plasma en el grupo control y los diferentes grupos experimentales.

Determinaciones bioquímicas	CONTROL	DH	DH + SIMVASTATINA	HFD + HOJA
Lipídicos				
Triacilglicéridos (mg/dL)	119.66 ± 59.83 ^a	146.16 ± 64.70 ^a	126.16 ± 45.40 ^a	136.33 ± 66.96 ^a
Colesterol total (mg/dL)	60.83 ± 14.72 ^a	58.83 ± 12.28 ^a	53.00 ± 17.82 ^a	72.00 ± 18.92 ^a
HDL (mg/dL)	27.33 ± 6.37 ^a	25.83 ± 5.70 ^a	24.00 ± 7.58 ^a	33.00 ± 8.31 ^a
LDL (mg/dL)	9.50 ± 7.68 ^a	11.00 ± 7.18 ^a	5.00 ± 4.85 ^a	11.66 ± 7.58 ^a
VLDL (mg/dL)	24.00 ± 11.74 ^a	29.16 ± 13.02 ^a	25.33 ± 9.02 ^a	27.33 ± 13.60 ^a
Carbohidratos				
Glucosa (mg/dL)	107.00 ± 9.89 ^a	106.50 ± 17.67 ^a	104.00 ± 14.14 ^a	97.00 ± 4.24 ^a
Proteínas				
Proteínas totales (mg/mL)	15.99 ± 2.3 ^a	12.77 ± 5.46 ^a	18.96 ± 0.86 ^a	18.50 ± 0.85 ^a
Albumina (mg/mL)	3.58 ± 0.52 ^a	2.99 ± 0.68 ^a	3.51 ± 0.17 ^a	3.10 ± 0.25 ^a
SGOT (U/L)	116.66 ± 11.55 ^a	75.16 ± 19.06 ^a	113.66 ± 64.41 ^a	105.00 ± 62.41 ^a
SGPT (U/L)	52.00 ± 9.46 ^a	52.66 ± 6.53 ^a	74.83 ± 39.40 ^a	54.33 ± 13.63 ^a
Los valores son expresados como la media ± SD (n=6, ANOVA seguido de Tukey, valores estadísticamente diferentes (^a , ^b , ^c) entre grupos (P≤0.05).				

En una investigación realizada por Muñoz *et al.*, (2018) encontró que las ratas Sprague-Dawley bajo una dieta hipercalórica similar a la que se utilizó en este estudio, presentaron un aumento de peso corporal y un alto índice de adiposidad, sin embargo, el perfil de lípidos y las transaminasas no presentaron incrementos con respecto al control como se observó en nuestro estudio. Auberval *et al.*, (2014) encontró que ratas Wistar a pesar de haber tenido una dieta alta en grasas durante 2 meses no demostraron tener cambios en el nivel del colesterol, resultado semejante a este estudio. En un trabajo realizado por Huang *et al.*, (2016) reportó que una dieta alta en calorías con ratas Sprague-Dawley tuvieron un incremento en el índice de adiposidad (total de tejido adiposo corporal) de manera similar que en nuestro estudio con las ratas alimentadas con la DH.

DISCUSIÓN

Las dietas ricas en grasas son muy apetecibles e inducen la obesidad, de igual importancia estas dietas tienen diferentes efectos metabólicos y moleculares (Buettner *et*

al., 2006; Von-Diemen *et al.*, 2006). Los efectos de la obesidad han sido ampliamente estudiados en animales de experimentación. Sin embargo, hay poca información disponible sobre las relaciones entre la obesidad y los parámetros morfométricos en ratas, así como las mediciones morfométricas y el perfil bioquímico (Novelli *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que puede darse la condición de obesidad en ratas, sin embargo, puede no haber cambios en el perfil lipídico a pesar de las ratas sean alimentadas con una dieta alta en grasas. Esto puede deberse a que en una etapa temprana del desarrollo de la alteración metabólica, la dieta alta en grasas está dirigida a la deposición en el tejido adiposo que todavía conserva la capacidad de absorción de los ácidos grasos libres circulantes que evitan el almacenamiento en el hígado y el daño en este órgano, de esta manera, se encuentra un índice de adiposidad más alto y un índice de Lee con un aumento en el peso de las ratas tratadas con una dieta hipercalórica. (Flatt, 1995; Muñoz *et al.*, 2018).

Se ha reportado anteriormente que el extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* no suprime la ingesta de calorías en ratas (López-Mejía *et al.*, 2019). Se ha reportado que el extracto de la hoja de *C. citrinus* tiene capacidad inhibitoria de la α -glucosidasa por lo cual reduce la absorción de carbohidratos y la producción de glucosa gastrointestinal (Fayemi *et al.*, 2019). Los tres compuestos mayoritarios en el extracto de hoja de *C. citrinus* son el limoneno (9.12%), el 1,8-cineol (14.73 %) y el α -terpineol (5.41%) (Petronilho *et al.*, 2013). El extracto de *Lippia turbinata* (Griseb) presenta una composición química similar a *C. citrinus*, dicha planta ha demostrado tener una actividad anti-lipasa (Quiroga *et al.*, 2013). Por lo tanto, el extracto de *C. citrinus* podrían tener una acción anti-obesogénica al modular el metabolismo de las grasas y los carbohidratos para una reducción significativa del peso corporal como se refleja en los resultados de los parámetros morfométricos y la disminución de la grasa en el tejido adiposo.

CONCLUSIÓN

El efecto que tuvo el extracto de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels contra la obesidad inducida por una dieta alta en grasas y azúcares en ratas Wistar demostró ser un efecto anti-obesogénico, debido a que los resultados de este estudio establecieron que la

suplementación diaria del extracto de hojas de *C. citrinus* puede revertir el aumento del peso corporal, la disminución de la formación de tejido adiposo y la prevención de daños hepáticos causados por la obesidad en el modelo *in vivo*.

LITERATURA CITADA DE CAPÍTULO I.

- Ahmed, F., and Rahman, M. S. 2016. Preliminary assessment of free radical scavenging, thrombolytic and membrane stabilizing capabilities of organic fractions of *Callistemon citrinus* (Curtis.) skeels leaves. BMC complementary and alternative medicine. 16(1): 247.
- Amancio-Chassin O., Ortigoza Ramírez J., Durante Montiel I. 2007. Obesidad. Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2007/may_01_ponencia.html. Último acceso: 22 de enero de 2019.
- American Institute of Nutrition (AIN-93M). 1993. Rodent diet. Sitio web: <http://www.zeiglerfeed.com/Literature/Purified%20Rodent%20Diet%20AIN-93M.pdf>. Último acceso: 10 de enero de 2020.
- Auberval, N., Dal, S., Bietiger, W., Pinget, M., Jeandidier, N., Maillard-Pedracini, E., Sigrist, S. 2014. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. Diabetology & metabolic síndrome. 6(1): 130.
- 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.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., Bollheimer, L. C. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. Journal of molecular endocrinology. 36(3): 485-501.
- 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.

- Flatt, J. P. 1995. Use and storage of carbohydrate and fat. *The American journal of clinical nutrition*. 61(4): 952S-959S.
- García-Berumen, C. I., Ortiz-Avila, O., Vargas-Vargas, M. A., del Rosario-Tamayo, B. A., Guajardo-López, C., Saavedra-Molina, A., Cortés-Rojo, C. 2019. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. *Lipids in Health and Disease*. 18(1): 78.
- Huang, C. C., Tung, Y. T., Huang, W. C., Chen, Y. M., Hsu, Y. J., Hsu, M. C. 2016. Beneficial effects of cocoa, coffee, green tea, and garcinia complex supplement on diet induced obesity in rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 16(1): 100.
- López-Mejía A. 2018. Efecto protector del extracto de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido en rata. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
- 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.
- Muñoz, S., Méndez, L., Dasilva, G., Torres, J., Ramos-Romero, S., Romeu, M., Medina, I. 2018. Targeting Hepatic Protein Carbonylation and Oxidative Stress Occurring on Diet-Induced Metabolic Diseases through the Supplementation with Fish Oils. *Marine drugs*. 16(10): 353.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001, (Primera Sección) 107. Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf. Último acceso: 10 de mayo de 2019.

- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Novelli Filho, J. L. V. B. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*. 41(1): 111-119.
- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygodlo, J. A., Nepote, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science & Technology*. 48(3): 642-649.
- Sampath, S., Kalimuthu, B., Veeramani, V., Janardhanam, S., Baran, M. A., and Chellan, R. 2016. Evaluation of total antioxidant and free radical scavenging activities of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels extracts by biochemical and electron paramagnetic resonance analyses. *RSC advances*. 6(15): 12382-12390.
- Sampath, S., Veeramani, V., Krishnakumar, G. S., Sivalingam, U., Madurai, S. L., Chellan, R. 2017. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1, 8-Cineole-containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 93: 296-307.
- Tung, Y-C., Hsieh, P-H., Pan, M-H., Ho, C-T. 2017. Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25: 100-110.
- Von-Diemen, V., Trindade, E. N., Trindade, M. R. M. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 21(6): 425-429.

6.2. Capítulo II.

Efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre los marcadores del estrés oxidativo en el hígado y corazón de ratas obesas por una dieta hipercalórica.

RESUMEN

El estrés oxidativo como agente causante de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno ha sido identificado como principal factor involucrado en la formación de productos altamente oxidantes durante el consumo de dietas hipercalóricas. Esto ha impulsado a la búsqueda de estrategias para disminuir los biomarcadores de estrés oxidativo, mismos que deterioran funciones celulares y a mejorar el estado redox del glutatión, antioxidante que contrarresta el daño en la célula. El objetivo del estudio fue investigar el efecto del extracto de hoja de *C. citrinus* sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en hígado y corazón de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica. Las ratas obesas mostraron un aumento en la carbonilación de proteínas, una lipoperoxidación incrementada y una reducción en el contenido de glutatión en el estudio. El extracto de *C. citrinus* ejerció un efecto benéfico al disminuir la formación de estos productos oxidativos y mantener el contenido de glutatión en hígado y corazón de las ratas.

Palabras clave: Obesidad, lipoperoxidación, proteínas carboniladas, glutatión reducido, *Callistemon citrinus*, antioxidantes.

ABSTRACT

Oxidative stress as the causative agent of the overproduction of reactive oxygen species has been identified as the main factor involved in the formation of highly oxidizing products during the consumption of hypercaloric diets. This has prompted the search for strategies to reduce biomarkers of oxidative stress, which deteriorate cellular functions and improve the redox state of glutathione, an antioxidant that counteracts cell damage. The aim of the study was to investigate the effect of *C. citrinus* leaf extract on biomarkers of oxidative stress in the liver and heart of rats fed a hypercaloric diet. Our results showed that in the liver and heart of obese rats had an increase in protein carbonylation, increased lipoperoxidation products and a reduction in glutathione content

Meanwhile the extract of *C. citrinus* exerted a beneficial effect by decreasing the formation of these oxidative products and maintaining the glutathione content in the liver and heart of the rats.

Keywords: Obesity, lipid peroxidation, carbonylated proteins, reduced glutathione, *Callistemon citrinus*, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

El estrés nutricional causado por una dieta alta en grasas y carbohidratos promueve el estrés oxidativo, como lo evidencian la formación de productos de peroxidación lipídica, la carbonilación de proteínas y los niveles reducidos de glutatión (GSH) (biomarcadores de estrés oxidativo) en los órganos. Estos cambios conducen a la iniciación y al desarrollo de varias enfermedades crónicas, tales como diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Rani *et al.*, 2016). Los extractos etanólicos de hojas de *C. citrinus* tienen un contenido importante de compuestos fitoquímicos (terpenos, compuestos fenólicos y flavonoides) que presenta una alta capacidad antioxidante *in vitro* por lo que se recomienda realizar investigación con fines terapéuticos en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (López-Mejía, 2018). El objetivo de este capítulo es determinar el efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre los marcadores del estrés oxidativo en el hígado y corazón de ratas obesas por una dieta hipercalórica.

METODOLOGÍA

Modelo experimental de obesidad en rata Wistar por dieta hipercalórica

El cuidado de los animales, la experimentación y el empleo de la dieta hipercalórica en las ratas se describe en el capítulo I de la presente tesis.

Preparación de homogenados de hígado y corazón para proteínas carboniladas, glutatión reducido, malondialdehído y 4-hidroxinonenal.

Se pesó 0.25 gramos de hígado o corazón, después ambos tejidos se homogenizaron en un mortero agregando 1 mL de buffer de fosfato (10 mM; pH 7.4) y se agregó 5 µL de BHT (5 mM) para las proteínas carboniladas y productos de lipoperoxidación, finalmente

se centrifugo a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se filtró el sobrenadante para su posterior uso (Magaña-Rodríguez, 2018).

Proteínas totales

Las proteínas totales fueron determinadas usando el método de Bradford (1976) adaptado para cuantificar bajas concentraciones mediante un micrométodo disponible comercialmente (marca Sigma). Se usó 1 µL de homogenado de hígado y corazón, después se le adicionó 799 µL de agua destilada, se mezcló y posteriormente se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford, se incubo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Para el blanco solo se agregó 800 µL de agua destilada y el Bradford.

Técnica de malondialdehído y 4-hidroxinonenal

El ensayo de MDA y hidroxialquenos se realizó de acuerdo con el método de Johnston *et al.*, (2007) con ligeras modificaciones. Para la determinación MDA en hígado y corazón, se agregaron 650 µL de 1-metil-2-fenilindol 10 mM y 200 µL de muestra de homogenado del tejido a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, mezclado con vórtex, después de lo cual se agregaron 150 µL de HCl al 37%. La mezcla de la reacción se incubó a 45°C durante 60 minutos, luego se colocó en hielo para detener la reacción y se midió a 586 nm. El ensayo para el total de hidroxialquenos más MDA se realizó de acuerdo con el ensayo de MDA descrito anteriormente, excepto que el ácido clorhídrico se reemplazó con el mismo volumen de ácido metanosulfónico al 37%. El blanco únicamente no llevo muestra de homogenado y el volumen de este fue reemplazado con buffer de fosfatos (10 mM, pH 7.4). El contenido de estos marcadores se expresó en mM MDA/g de tejido y mM HNE/g de tejido.

Técnica de proteínas carboniladas

La determinación de las proteínas carboniladas permite confirmar el alto grado de estrés oxidativo derivado de los productos de oxidación lipídica. Para la determinación de proteínas carboniladas se llevó a cabo el método de Levine *et al.*, (1999). El fundamento

de este método consiste en que la DNPH reacciona con los grupos reactivos carbonilo, originando la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona estable.

Los homogenados de hígado y corazón deben tener 1 mg de proteína para ser llevados a 200 μ L de buffer de fosfatos (10 mM, pH 7.4), después se agregó 800 μ L de DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazina) (10 mM disuelto en HCl 2 M) y al mismo tiempo se realizó un duplicado en el cual se sustituyó la DNPH por HCl (2 M); se mezcló e incubó en obscuridad a temperatura ambiente durante 15 min, luego se agregó 250 μ L de ácido tricloroacético/agua desionizada (50% v/v), se mezcló con vortex y de nuevo se incubó a 20° C por 30 min. Luego se centrifugó a 5,000 rcf por 7 min y se tiró el sobrenadante sin mover el pellet formado, se prosiguió a lavar el pellet con 1 mL de acetato de etilo/etanol (1/1 v/v) dejando reposar con el solvente de lavado por 10 min (haciendo tres lavados en total a partir de centrifugar a 5,000 rcf por 7 min); después de centrifugar por tercera ocasión se dejó secar el pellet y se resuspendió con 1 mL de hidrocloreto de guanidina (6 M, disuelto en buffer de fosfatos 20 mM con pH 2.3), por último, se centrifugaron a 2,000 rpm por 1 min y posteriormente se midieron las muestras a una absorbancia de 370 nm utilizando como blanco hidrocloreto de guanidina 6 M. La concentración de PCO se expresó como μ M usando la ecuación: $[\mu\text{M PCO}] = (10^6 * (\text{Muestra de absorbancia versus el coeficiente de extinción molar de } 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}))$.

Técnica de glutatión reducido

Mediante la técnica de Sedlak y Lindsay (1968) se determinó el contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado y corazón de la siguiente forma: en eppendorf se agregaron 62.5 μ L de homogenado del tejido, 187.5 μ L de Tris buffer (0.2 M, pH 8.2) y 12.5 μ L de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB) (0.01 M), se mezcló y posteriormente se adicionaron 987.5 μ L de metanol absoluto, luego se colocaron en un mezclador de laboratorio (shaker) a 240 rpm durante 15 minutos, después las muestras se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, se desarrolló el color amarillo de la reacción y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 412 nm. Las unidades fueron expresadas como mM GSH/g de tejido.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron con análisis de varianza (ANOVA) de una vía de JMP versión 8.0 seguido de la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples con el grupo de control, se consideró un nivel de significancia de $*P \leq 0.05$. Los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism versión 8.0.

RESULTADOS

Malondialdehído y 4-hidroxinonenal

En cuanto a la concentración de malondialdehído y 4-hidroxinonenal en hígado se encontró que el tratamiento DH tuvo un incremento significativo en estos productos (35.64% en MDA y 69.49% en HNE) de lipoperoxidación comparada con el grupo control, además, en los tratamientos DH + simv y DH + hoja no se encontraron cambios en la concentración con respecto al control (diferencias del 20.01% y 20.55%, respectivamente) (fig. 5).

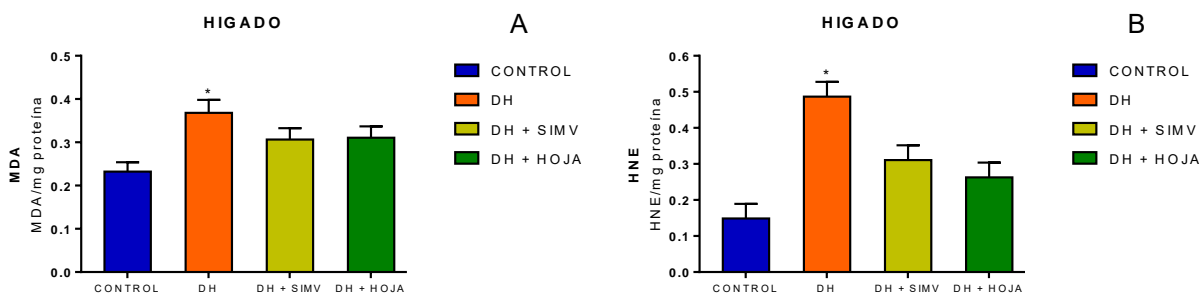


Figura 5. Malondialdehído (A) y 4-hidroxinonenal (B) en el hígado del grupo control y los diferentes tratamientos. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=6$).

Por otro lado, la concentración de MDA en corazón de los diferentes grupos experimentales no se vio afectada manteniendo similitud con el grupo control, no obstante, en el grupo DH se incrementó significativamente (un 79.64%) en el 4-HNE con respecto al grupo control, y en los grupos DH + simv (diferencia del 15.97% con control)

y DH + hoja (15.06% con diferencia al control) no se encontraron cambios significativos en los niveles de concentración con respecto al control (fig. 6).

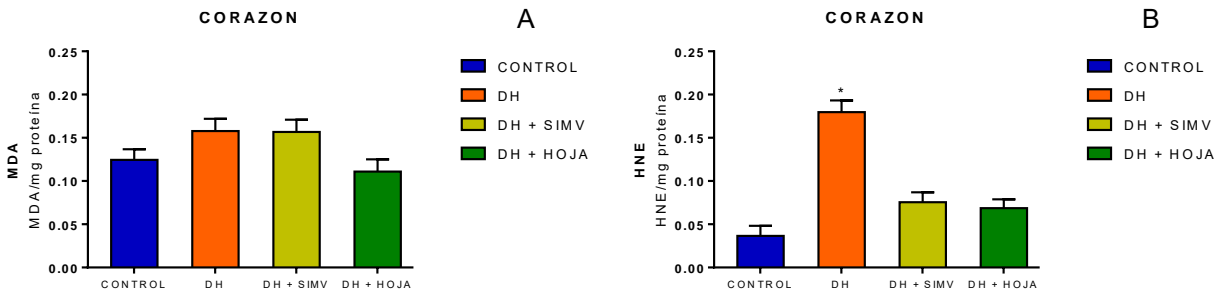


Figura 6. Contenido de malondialdehído y 4-hidroxinonenal en el corazón del grupo control y los diferentes tratamientos. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=6$).

De acuerdo con nuestros resultados, la simvastatina causó un decremento significativo del contenido de MDA del 16.7% en hígado y para HNE en hígado y corazón del 36.16% y 58%, respectivamente, con relación al grupo DH. De igual manera con el extracto de hoja se observó una disminución significativa de MDA del 15.61% y para HNE del 46% en el hígado, mientras que en el corazón se mostró una disminución del 61.84% en HNE con respecto al grupo DH. En cuanto a niveles de MDA en corazón se observó una tendencia a disminuir del 0.70% para simvastatina y del 29.73% para extracto de hoja en relación al grupo DH.

Por lo tanto, la administración de simvastatina y extracto de hoja presentaron un decremento en el contenido de MDA y HNE en hígado y corazón de las ratas contra el grupo DH. Sin embargo, los productos de la lipoperoxidación en estos tratamientos fueron similares al de las ratas control.

Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Ayala-Ruiz (2019) quien demostró una disminución estadísticamente significativa en MDA y HNE en hígado de rata después de la administración de simvastatina (3 mg/kg/día durante 6 semanas) y Macan *et al.*, (2015) reportó un decremento significativo de MDA en hígado (9%) y corazón (11%) de ratas cuando se les administró simvastatina a 10 mg/kg durante 10 días. Resultados similares fueron confirmados por experimentos de Magaña-Rodríguez

(2018) quien comprobó una disminución de MDA y HNE en hígado de rata con cáncer de colon bajo la administración de hoja de *C. citrinus* (250 mg/kg/día durante 21 semanas). Mnafgui *et al.*, (2015) usando fluvastatina (2 mg/kg/día) y ácido cinámico (30 mg/kg/día) por 7 semanas obtuvo un efecto cardioprotector (Mnafgui *et al.*, 2015) y Bais *et al.*, 2014 encontró un efecto hepatoprotector con extracto de *Moringa oleífera* (200 y 400 mg/kg/día por 7 semanas) en ratas.

Proteínas carboniladas

En el hígado y el corazón el contenido de proteínas carboniladas (PCO) tuvo un incremento significativo en el grupo DH (45.48% en el hígado y 58.58% en corazón comparado con el control), mientras tanto, para ambos órganos el grupo DH + simv y DH + hoja son semejantes al control (fig. 7), únicamente se presentó una diferencia del 0.55% en el grupo administrado con simvastatina y del 6.70% en el grupo hoja en el hígado con relación al control, mientras que en el corazón las diferencias fueron del 0.08% en el grupo simvastatina y 0.96% con diferencia al control.

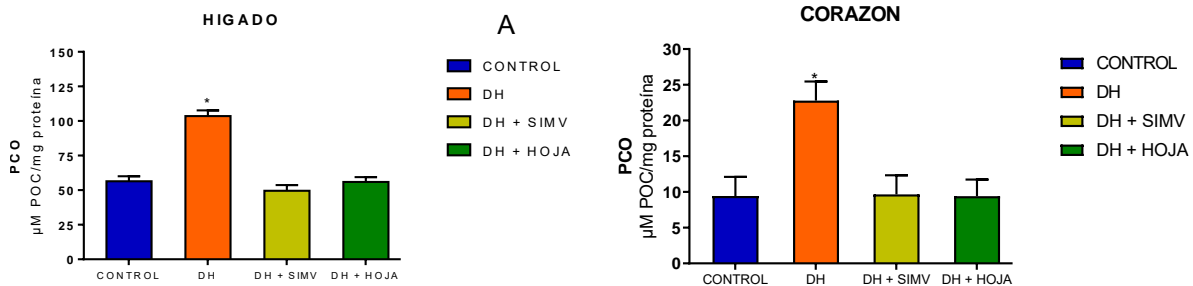


Figura 7. Contenido de proteínas carboniladas en hígado (A) y corazón (B) del grupo control y los diferentes tratamientos. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=6$).

Nuestros resultados están de acuerdo con los resultados de Noeman *et al.*, (2011) quien obtuvo datos similares donde el contenido de proteínas carboniladas en el hígado y corazón aumentan significativamente en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica en comparación con ratas normales.

Glutati3n reducido

El contenido total de glutati3n reducido disminuy3 considerablemente en h3gado (33.16%) y coraz3n (12.79%) del tratamiento DH siendo esta una disminuci3n significativa comparada con el grupo control, adem3s en ambos 3rganos el GSH en los grupos DH + simvastatina y DH + hoja presentaron concentraciones de GSH similares al grupo control. En el caso del h3gado, se present3 una diferencia del 15.19% en el grupo simvastatina y 3.5% en el grupo hoja, ambos grupos comprados con el control, en el coraz3n para el grupo administrado con simvastatina y con hoja las diferencias fueron del 3.32% y 2.22%, respecto a control (fig. 8).

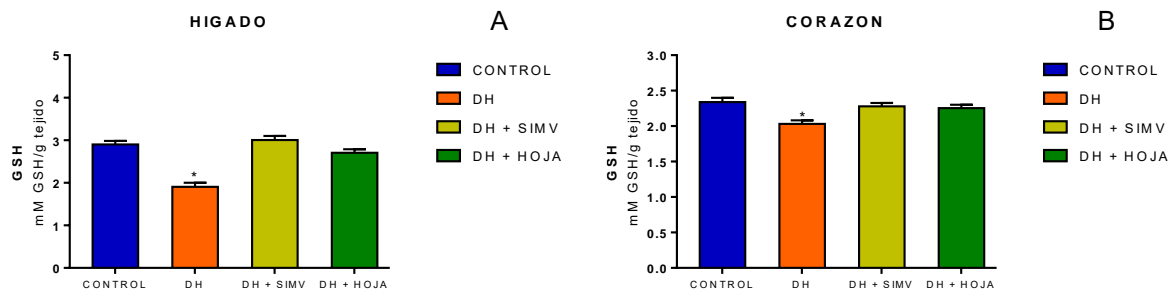


Figura 8. Contenido de glutati3n reducido en ratas control y los diferentes tratamientos experimentales en el h3gado (A) y coraz3n (B). Los valores se presentan como media \pm error est3ndar (prueba de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=6$).

El aumento de los aductos de prote3nas, del MDA y 4-HNE esta correlacionado con la disminuci3n de los niveles de GSH, este resultado confirma el efecto antioxidante del GSH sobre los productos de lipoperoxidaci3n, nuestros resultados son semejante a lo reportado por Deng *et al.*, (2019) donde en las ratas del grupo DH mostraron disminuciones significativas en los niveles GSH ($P \leq 0.05$) en comparaci3n con el grupo control. Por el contrario, los niveles de MDA en el grupo DH fueron significativamente m3s altos en comparaci3n con los del grupo control.

DISCUSIÓN

Las especies reactivas de oxígeno son capaces de dañar muchas macromoléculas biológicas como el ADN, ARN, proteínas y lípidos. Como resultado de este proceso, los ácidos grasos insaturados forman hidroperóxidos, que se descomponen aún más en productos de oxidación secundarios, principalmente aldehídos, tales como el malondialdehído (MDA) y el aldehído insaturado tal como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Fang *et al.*, 2002; Frankel, 2005) El consumo de niveles altos de grasas en la dieta causa estrés oxidativo en los órganos de rata, principalmente en el hígado ya que este órgano participa en el metabolismo de los lípidos, por lo tanto, es propenso a un daño oxidativo potencial (Lecumberri *et al.*, 2007).

En general, los compuestos carbonílicos formados de forma endógena durante la peroxidación lipídica y la glicoxidación de carbohidratos son precursores de los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs) y los productos finales de la peroxidación lipídica avanzada (ALEs), que se forman por enlaces cruzados en las proteínas tisulares (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Smit y Lutgers, 2004), de este manera los procesos de oxidación cambian las estructuras de las proteínas y, a menudo, se asocian con la desnaturalización de las proteínas y la pérdida de la función biológica (Grune, 2000; Mehlhase y Grune, 2002).

El aumento de la PCO en el hígado y corazón de ratas con obesidad, puede deberse por el aumento de las ROS generadas durante la obesidad (Uzun *et al.*, 2007) y al daño generado por el MDA y HNE que están incrementados en estos órganos, cabe mencionar que el 4-HNE puede reaccionar con residuos de histidina (His), cisteína (Cis) o lisina (Lis) de las proteínas, lo que lleva a la formación de aductos de Michael estables con una estructura hemiacetal (Schaur, 2003), así mismo, el MDA reacciona con los residuos de Lis formando bases de Schiff (Esterbauer, 1993).

La inhibición de la formación de PCO en hígado por acción del extracto de hoja y simvastatina, involucra el uso de antioxidantes, que bloquean el estrés oxidativo, ya que parte de este mecanismo puede deberse que previenen de la peroxidación de lípidos, la generación de aldehídos y el uso de eliminadores de carbonilo, que interactúan más específicamente con aldehídos y neutralizan la formación de aductos (Peyroux y

Sternberg, 2006), como se observa en la igualdad del contenido de PCO, MDA y 4-HNE en hígado y corazón de las ratas de grupo simvastatina y grupo hoja con respecto a control. Además, el sistema no enzimático está constituido por una gran variedad de sustancias antioxidantes, que pueden tener un origen endógeno (GSH) o a través de los alimentos, entre los que se destacan los compuestos fenólicos (Barbosa *et al.*, 2010). Por otra parte, las estatinas han sido utilizadas en estudios con ratas obesas a manera de grupo estándar, ya que esto permite comparar la actividad farmacológica de las estatinas con algún compuesto o extracto vegetal de interés, lo cual puede explicar, al menos en parte, un posible mecanismo por el cual estos extractos o compuestos vegetales son benéficos para la obesidad (Mnafgui *et al.*, 2015; Bais *et al.*, 2014). Lo que indica que los efectos antioxidantes pueden contribuir en parte a las propiedades pleiotrópicas clínicas (efectos antiinflamatorios, inmunomodulatorios, antitrombóticos, antiproliferativos y antioxidantes) de esta clase de fármacos (Echeverri *et al.*, 2005). De igual manera el glutatión reducido desempeña un papel muy importante en el metabolismo celular, ya que participa en procesos de detoxificación de xenobioticos (a través de reacciones de conjugación) y defensa antioxidante (es un compuesto altamente reductor). Por lo cual, se ha reportado que las disminuciones en el contenido celular de este biomarcador están directamente involucradas con daño por estrés oxidativo (peroxidación lipídica) (Pérez-Mora, 2016). El hecho de que el extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* mantenga los niveles de GSH constantes (o en algunos casos, aumentarlos) o en niveles normales sugiere una alta actividad antioxidante de esta planta.

De este modo, el extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* y simvastatina son agentes antioxidantes que previenen del incremento de la peroxidación lipídica y proteínas carboniladas, por lo cual cabe destacar el papel protector del extracto de hoja en la prevención del daño hepático y cardiaco causado por el estrés oxidativo por una dieta alta en grasas.

CONCLUSIÓN

El consumo continuo de una dieta con altos niveles en grasas y alta en fructosa generó estrés oxidativo en ratas: los niveles de proteínas carboniladas, MDA y 4-hidroxinonal aumentaron, mientras que los niveles de GSH disminuyeron. Por otro lado, la

administración de simvastatina y extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* disminuyeron la formación de estos productos oxidativos y se mantuvo el contenido de glutatión reducido de igual manera que las ratas control. Por lo tanto, el equilibrio oxidante-antioxidante inducido por el extracto de *C. citrinus* a lo largo de la DH parece evitar la progresión del estrés oxidativo.

LITERATURA CITADA DE CAPÍTULO II.

- Ayala-Ruiz L. A. 2019. Efecto de la simvastatina sobre los biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado de ratas inducidas a una dieta rica en grasas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
- Bais, S., Singh, G. S., Sharma, R. 2014. Antiobesity and hypolipidemic activity of Moringa oleifera leaves against high fat diet-induced obesity in rats. *Advances in Biology*. 2014.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. D. C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*. 23(4): 629-643.
- 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.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in molecular medicine*. 9(4): 169-176.
- Deng, Y., Tang, K., Chen, R., Nie, H., Liang, S., Zhang, J., Yang, Q. 2019. Berberine attenuates hepatic oxidative stress in rats with non-alcoholic fatty liver disease via the Nrf2/ARE signalling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*. 17(3): 2091-2098.
- Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F. R. 2005. Efectos pleiotrópicos de las estatinas. Características farmacológicas útiles en la prevención, tratamiento y regresión de la enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*. 12(3): 95-102.
- Esterbauer, H. 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American journal of clinical nutrition*. 57(5): 779S-786S.

- Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 18(10): 872-879.
- Frankel, N.E. 2005. *Lipid Oxidation*. The Oily Press, Bridgwater, England.
- Grune, T. 2000. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology*. 1(1): 31-40.
- 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: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45(2): 108-112.
- Lecumberri, E., Goya, L., Mateos, R., Alía, M., Ramos, S., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L. 2007. A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*. 23(4): 332-341.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Stadtman, E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology*. 186: 464-478.
- López-Mejía A. 2018. Efecto protector del extracto de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido en rata. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
- Macan, M., Vukšić, A., Žunec, S., Konjevoda, P., Lovrić, J., Kelava, M., Bradamante, V. 2015. Effects of simvastatin on malondialdehyde level and esterase activity in plasma and tissue of normolipidemic rats. *Pharmacological Reports*. 67(5): 907-913.
- 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.
- Mehlhase, J., Grune, T. 2002. Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biological chemistry*. 383(3-4): 559-567.
- Mnafgui, K., Derbali, A., Sayadi, S., Gharsallah, N., Elfeki, A., Allouche, N. 2015. Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *Journal of food science and technology*. 52(7): 4369-4377.

- 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): 17.
- Pérez-Mora S. 2016. Evaluación del extracto de hoja y flor de *Callistemon citrinus* sobre el perfil lipídico y la actividad del sistema antioxidante en hígados de ratas Wistar. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.
- Peyroux, J., Sternberg, M. 2006. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie*. 54(7): 405-419.
- Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., Yadav, U. C. 2016. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences*. 148: 183-193.
- Schaur, R. J. 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular aspects of medicine*. 24(4-5): 149-159.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 25: 192-205.
- Smit, A. J., Lutgers, H. L. 2004. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Current medicinal chemistry*. 11(20): 2767-2784.
- Uzun, H., Konukoglu, D., Gelisgen, R., Zengin, K., Taskin, M. 2007. Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients. *Obesity surgery*. 17(10): 1367-1373.
- Venereo-Gutiérrez, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*. 31(2): 126-133.

6.3. Capítulo III.

Efecto del extracto etanólico de hoja de *C. citrinus* sobre las actividades de las enzimas antioxidantes y detoxificante en el hígado y corazón en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

RESUMEN

Durante el consumo de dietas hipercalóricas se da una sobreproducción celular de radicales libres, por lo cual, la célula cuenta con sistemas enzimáticos que permiten contrarrestar el daño causado por el estrés oxidativo en la obesidad. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto del extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* sobre las enzimas antioxidantes y detoxificantes en el hígado y corazón de ratas alimentadas con una dieta hipercalórica. Las actividades enzimáticas del sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx, PON1 y GST) en el hígado y corazón del grupo tratado con la dieta rica en grasa (DH) se vieron afectadas. Mientras que en el grupo tratado con el extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* las actividades enzimáticas se mantuvieron similar al grupo control. Este resultado sugiere un efecto protector de *C. citrinus*.

Palabras clave: Obesidad, actividad antioxidante enzimática, actividad detoxificante enzimática, *Callistemon citrinus*.

ABSTRACT

Consumption of hypercaloric diets can produce an overproduction of free radicals, however, the cell has enzymatic systems that allow to counteract the damage caused by oxidative stress in obesity. The aim of this work was to investigate the effect of *C. citrinus* extract on antioxidant and detoxifying enzymes in the liver and heart of rats fed a hypercaloric diet. In this study the enzymatic activities (SOD, CAT, GPx, PON1 and GST) in the liver and heart were affected in the group fed with high fat diet, meanwhile the treatment of obese rat with the ethanolic extract of *C. citrinus* leaves, resulted in a significant protecting against free radicals, keeping the enzymatic activities (SOD, CAT, GPx, PON1 and GST) in the liver and heart similar to the control group.

Keywords: Obesity, enzymatic antioxidant activity, enzymatic detoxifying activity, *Callistemon citrinus*.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son cruciales en el metabolismo, debido a que todos los componentes celulares pueden interactuar con varias enzimas, y en efecto algunas enzimas se denominan objetivo farmacológico (Demir *et al.*, 2016). Naturalmente los antioxidantes se usan para minimizar algunas enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo. Sin embargo, las plantas incluyen varios compuestos naturales que pueden ser importantes para algunos padecimientos de los seres vivos. Por lo tanto, el uso de plantas tiene un lugar importante en la medicina (Krishnaiah *et al.*, 2011). *Callistemon citrinus* contiene gran cantidad de compuestos bioactivos que han demostrado que podrían intervenir en la inducción de enzimas antioxidantes y de enzimas de fase II durante procesos de estrés oxidativo (Kumar *et al.*, 2011; López-Mejía, 2018). Por lo que el objetivo de este capítulo es evaluar la capacidad de inducción de estas enzimas por el extracto de hoja de *C. citrinus* en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica.

METODOLOGÍA

Proteínas totales

La concentración de proteínas en los homogenados de hígado y corazón se midió con el método de Bradford (1976) como se menciona en el capítulo II de la presente tesis.

Determinación de la Superóxido dismutasa (SOD)

Con el método de Giannopolitis (1977) con ligeras modificaciones se determinó la actividad superóxido dismutasa por la generación de aniones superóxido que reduce el NTB (cloruro de tetrazolio nitroblue) a un producto de formazán. Se agregaron 641 μL de buffer de fosfato (0.067 M) más 10 μL de homogenados de hígado y corazón, 40 μL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.1 M) y 20 μL de cloruro de nitrotetrazolio azul (NTB) (1.5 mM), finalmente se le añadió 9 μL de riboflavina (0.1 mM), se mezcló suavemente, y las muestras se iluminaron a una distancia de 15 cm con una lámpara de 40 voltios, se expusieron durante 10 minutos y se midieron a 560 nm. El blanco contenía todos los componentes excepto la muestra de tejido y no se iluminó, y un segundo blanco con homogenado del órgano y no se iluminó. La actividad específica de la SOD se

expresa como U/mg de proteína, en hígado y corazón. Una unidad de actividad de la SOD se expresó como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la reducción de NBT.

Determinación de la Catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se mide en base a la desaparición del peróxido de hidrógeno usando el método de Aebi (1984). La mezcla de solución contiene 950 μL de buffer de fosfato 50 mM pH 7.0, 25 μL de hígado y corazón, y 25 μL de H_2O_2 30 mM como sustrato. El cambio de absorbancia se registró a 240 nm cada 30 s durante tres minutos. La actividad enzimática se expresó como U/mg de proteína de CAT utilizando un coeficiente de extinción molar de $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación de la Glutación peroxidasa (GPx)

La actividad de la enzima glutación peroxidasa se midió por el método de Prabhu *et al.*, (2001). La solución de trabajo contenía NADPH 0.5 mM, glutación reducido 100 mM, 1 unidad de la enzima glutación reductasa, buffer de fosfato 50 mM pH 7.0, e hidroperóxido de cumeno 30 mM. Se toman 975 μL de la solución de trabajo y 25 μL de homogenado de hígado y corazón. Finalmente, la absorbancia se registró a 340 nm y se midió cada 30 s durante 5 minutos. La actividad de la GPx se expresó como nmol/min por mililitro, usando el coeficiente de extinción molar $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación de la Glutación-S-transferasa (GST)

La actividad de la enzima glutación S-transferasa se midió de acuerdo a López-Mejía *et al.*, (2019). Se preparó una solución de trabajo que contenía: 980 μL de buffer de fosfato 0.1 M pH 6.5, 10 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CNDB) 100 mM como sustrato y 10 μL de glutación reducido, luego se mezcló ligeramente y se incubó a 30°C durante 15 min. Se tomó 1 μL del homogenado de hígado y corazón, y se agregaron 999 μL de solución de trabajo. La absorbancia se registró a 340 nm cada 30 s durante 5 min. La actividad enzimática se reporta como nmol de conjugado GSH-CDNB por minuto/mg de proteína, utilizando un coeficiente de extinción molar de $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación de la Paraoxonasa (PON1)

La actividad de la arilesterasa o PON1 se determinó según el método de Dantoine *et al.*, (1998). Para cada homogenado se tomaron 5 μ L de hígado y corazón y 1 mL de solución de trabajo que contenía: buffer Tris-HCl 25 mM pH 8.0, CaCl_2 10 mM y acetato de 4-nitrofenilo 1 mM como sustrato y se mezclaron los componentes. Se registró el aumento de la absorbancia debido a la hidrólisis del sustrato para formar p-nitrofenol y se midió a 402 nm cada 30 s durante 3 minutos, el blanco tenía agua para corregir la hidrólisis no enzimática. La actividad de la PON1 se basó en 1 μ M de fenol formado por minuto por mg de proteína, utilizando el coeficiente de extinción molar $14.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media. Para las determinaciones enzimáticas las diferencias estadísticas se determinaron con análisis de varianza (ANOVA) de una vía de JMP versión 8.0 seguido de la prueba post hoc de Dunnett para comparaciones múltiples con el grupo de control, se consideró un nivel de significancia de $*P \leq 0.05$. Los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism versión 8.0.

RESULTADOS

La actividad enzimática de la SOD en el hígado de las ratas del grupo DH mostró un decremento significativo ($P \leq 0.05$) (del 42.51%) con respecto al grupo control. En cuanto a la actividad de la SOD en los grupos DH + simvastatina y DH + *C. citrinus*, mantuvieron una similitud con relación al grupo control (16.12% y 5.97%, respectivamente). Por otro lado, en el corazón el grupo DH presentó un incremento significativo en la SOD ($P > 0.05$) (del 22.99%) en comparación al grupo control, y los grupos administrados con simvastatina y extracto de hoja de *C. citrinus* tuvieron una actividad enzimática de la SOD, similar al control (con 0.97% y 13.36%, respectivamente) (figura 9).

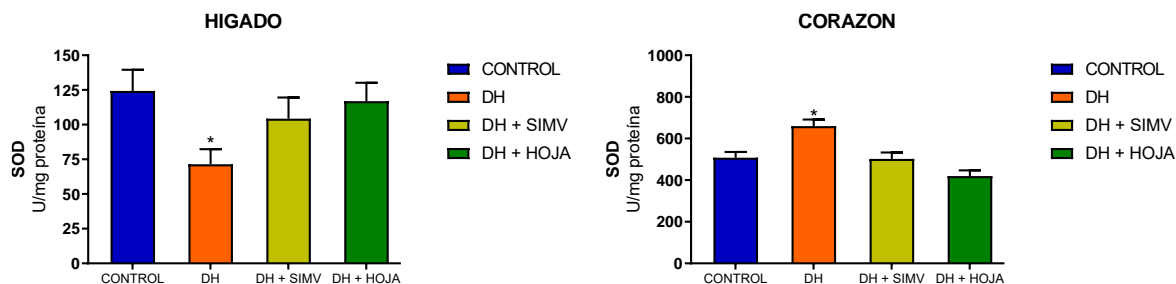


Figura 9. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=6$).

La actividad de la catalasa presentó un decremento notablemente en el grupo que se alimentó únicamente con la dieta hipercalórica (DH) en comparación al control, en el hígado (menor a 18.18%) y corazón (disminución del 30.16%) (fig. 10). Con relación a los grupos tratados con la dieta hipercalórica más el extracto de hoja y dieta hipercalórica más simvastatina no tuvieron diferencias significativas en cuanto a la actividad de esta enzima en estos órganos con respecto al control, para simvastatina en hígado fue una diferencia del 12.78% y en el grupo hoja del 11.76%, en el caso del corazón la diferencia en simvastatina fue del 15.62% y para hoja del 13.96%.

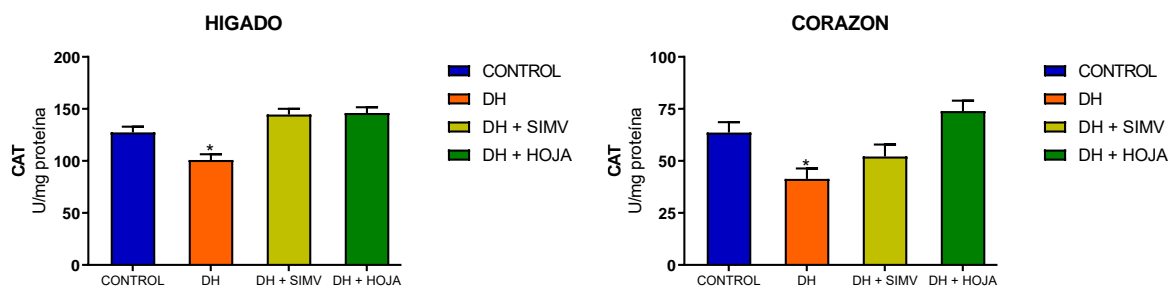


Figura 10. Actividad de la enzima catalasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=6$).

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa en el hígado disminuyó notablemente (49.47%) en el grupo DH, en cambio, en el corazón incremento (un 41.76%) respecto al grupo control. En el resto de los tratamientos (administrados con simvastatina y hoja) no hay diferencia estadística en cuanto a la actividad de esta enzima en ambos órganos (fig. 11), en hígado presentó una diferencia del 11.24% por encima del grupo control y en hoja por abajo del 14.47%, para el corazón las diferencias fueron del 0.24% en simvastatina y en hoja del 7.78% en comparación con el control.

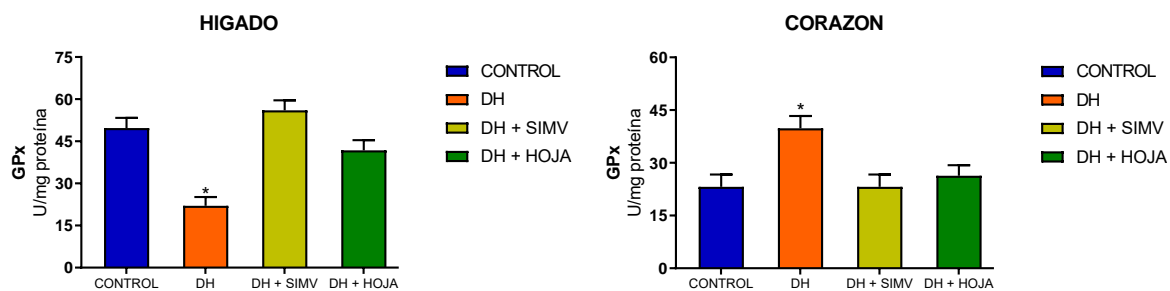


Figura 11. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, * $P \leq 0.05$, $n=6$).

Por otra parte, la actividad de la PON1, se encontró significativamente incrementada en el grupo DH con respecto a control, en el hígado con un 63.08% y en el corazón con un 37.99%. Nuevamente los grupos administrados con simvastatina y extracto de hoja de *C. citrinus* se comportaron similar al control en ambos órganos (fig. 12).

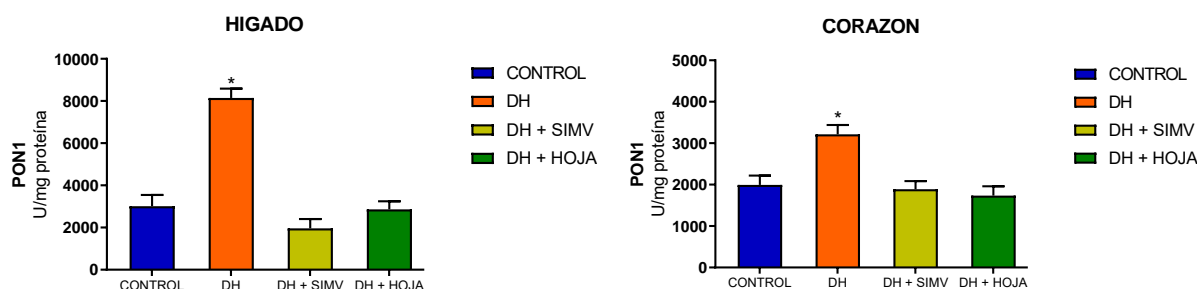


Figura 12. Actividad de la enzima paraoxonasa uno o arilesterasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=6$).

Por último, la actividad de la enzima GST (fig. 13), en el hígado fue menor ($p \leq 0.05$) (un 49.75%) y mayor en el corazón (37.12%) en el tratamiento DH a diferencia del grupo control. En los grupos DH, pero administrados con simvastatina (las diferencias fueron del 16.77% en hígado y del 0.58% en corazón, en comparación al control) y el extracto de hoja de *C. citrinus* (las diferencias fueron del 32.08% en hígado y del 18.49% en corazón, con respecto a control), la actividad de esta enzima no es diferente estadísticamente para los dos órganos en comparación al grupo control en estos tratamientos experimentales.

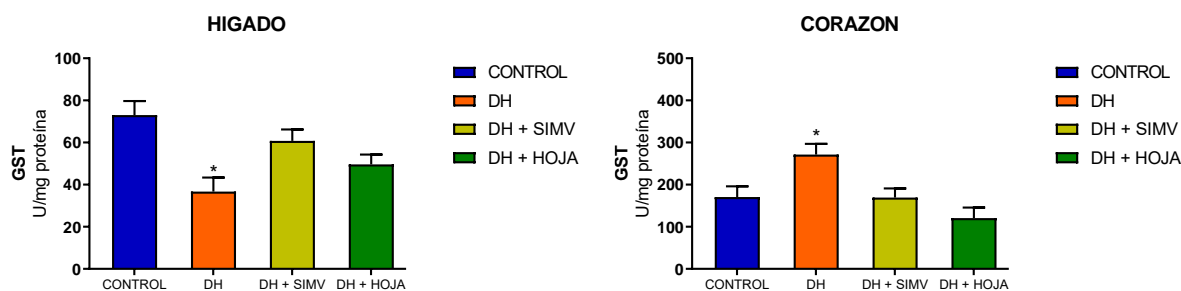


Figura 13. Actividad de la enzima glutatión s-transferasa en el hígado y corazón del grupo control y los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se presentan como media \pm error estándar (ANOVA seguido de Dunnett, $*P \leq 0.05$, $n=6$).

Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por Noeman *et al.*, (2011) quien encontró daños en los niveles de las actividades de la GPx, GST y PON en corazón y en hígado de ratas administradas con una dieta alta en grasas, estos valores enzimáticos son similares a las actividades de ambos órganos en las ratas alimentadas únicamente con una dieta hipercalórica como en nuestro estudio. Nuestros resultados también están de acuerdo con Jimoh *et al.*, (2018), que observó una reducción en el estrés oxidativo durante la obesidad asociada con una dieta alta en grasas en conejos administrados con resveratrol, que es eficaz como antioxidante, donde se mantuvo la estabilidad de las actividades de la SOD, CAT y GPx igual que en las ratas administradas con *C. citrinus* como se presentó en nuestra investigación.

Otro estudio de Anila y Vijayalakshmi, (2003) ha demostrado que en una condición asociada a la obesidad en ratas disminuyen las enzimas SOD, CAT y GPX en hígado y corazón, sin embargo, los flavonoides de *Mangifera indica* y *Emblica officinalis* logran restaurar vía inducción las enzimas del sistema enzimático en ambos órganos de igual forma que se observó con la administración de *C. citrinus*.

DISCUSIÓN

El hecho de que en el hígado y el corazón de los grupos administrados con simvastatina y hoja tengan actividades enzimáticas similares al control, indica que los extractos de *C. citrinus* ayudan a mantener la función normal de la SOD, CAT, GPx, PON1 y GST. Esto podría estar relacionado con la disminución del daño oxidativo en estos órganos del grupo tratado con el extracto de *C. citrinus*.

Durante el consumo de dietas hipercalóricas, la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos son vías metabólicas clave para la homeostasis energética en órganos como el hígado y el corazón. Sin embargo, esta adaptación metabólica aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres, lo cual produce un estrés oxidativo (Houten y Wanders, 2010; Begriche *et al.*, 2013). La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes puede deberse al rápido consumo y al agotamiento de estas enzimas en revertir el daño de los radicales libres generados durante el desarrollo de la obesidad (Noeman *et al.*, 2011), por lo tanto, las ratas tratadas

con *C. citrinus* fueron protegidas contra los daños oxidativos en los órganos analizados, posiblemente debido a los compuestos mayoritarios que presenta esta planta como son el 1,8-cineol, limoneno, α -terpineol y α -pineno (Petronihlo *et al.*, 2013; Sampath *et al.*, 2017) y actúan sinérgicamente para mantener el estado oxidante-antioxidante de las enzimas SOD, CAT y GPx. Por consiguiente, un aumento de la actividad de la SOD, CAT y GPx está asociado a una mayor protección contra el estrés oxidativo, por lo que el hecho de que el extracto de hoja de *C. citrinus* ayude a elevar la actividad estas enzimas es altamente significativo (López-Mejía, 2018).

Este efecto podría estar asociado por la inhibición de la formación de radicales libres que modula la actividad de eliminación de radicales que previene del estrés oxidativo. Estos fitoquímicos desempeñan el papel de antioxidantes para prevenir el estrés oxidativo como se informó anteriormente en la evaluación de antioxidantes totales de los extractos de *C. citrinus* (Curtis) Skeels (Sampath *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, *C. citrinus* tiene mecanismos potenciales de detoxificación-antioxidante mediante la regulación de las actividades de la enzima PON1 y la enzima de fase II GST, este efecto podría atribuirse a la inhibición de la formación de moléculas electrofílicas.

En una investigación realizada por Spitz *et al.*, (1991) demostró que el aumento en el nivel del GSH y la actividad enzimática de la GST *in vitro* tuvieron un incremento en la detoxificación del 4-HNE, dado que una mayor actividad de la GST permite una mayor desaparición del 4-HNE y la reacción depende de la concentración de GSH como sustrato para la GST, razón por la cual, sus resultados sugieren que el GSH y la GST proporcionan una vía biológicamente significativa para la protección contra el daño oxidativo por los subproductos aldehídicos que ocasionan la peroxidación lipídica de igual forma que en nuestro estudio. En este sentido, en trabajos previos han sido reportados en *C. citrinus* como anticancerígeno (López-Mejía *et al.*, 2019) antioxidante (Sampath *et al.*, 2016), antiinflamatorio (Radulović *et al.*, 2015) y antidiabético (Kumar *et al.*, 2011), propiedades que podrían contribuir a la buena salud de los órganos en condiciones de obesidad. Por lo tanto, *C. citrinus* mantuvo la concentración normal de ROS por la alta capacidad antioxidante (Sampath *et al.*, 2016; López-Mejía *et al.*, 2019) y disminuyó los riesgos de complicaciones oxidativas en la obesidad (Marseglia *et al.*, 2015) como se observó en ratas tratadas con *C. citrinus*. Los resultados obtenidos en el actual trabajo demuestran

la efectividad del extracto de *Callistemon citrinus* ya que ayudan a incrementar y mantener los niveles de las actividades enzimáticas durante la obesidad, es un importante hallazgo como mecanismo de protección y prevención contra el daño oxidativo en esta condición.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se encontró que a pesar de estar en una dieta hipercalórica las ratas con la administración de *Callistemon citrinus* se logró restaurar las actividades enzimáticas (SOD, CAT, GPx, PON1 y GST) en hígado y corazón, esta podría ser la razón principal para controlar los niveles basales de MDA, HNE y PCO (ver capítulo II) y el potencial de los fitoquímicos antioxidantes de *C. citrinus* junto con la participación de GSH para disminuir las ROS manteniendo un equilibrio redox al interactuar con las ROS a través de interacciones directas o mediante conjugación catalizada por las enzimas GPx y GST, reduciendo así las ROS que forman productos de peroxidación lipídica y posteriormente proteínas carboniladas. Los resultados de este estudio demostraron que la administración del extracto de *C. citrinus* puede prevenir de daños oxidativos hepáticos y cardíacos causados por la obesidad. Se recomienda más investigación para dilucidar los mecanismos de los compuestos con propiedades farmacológicas de *C. citrinus* en las diferentes vías moleculares durante la obesidad.

LITERATURA CITADA DE CAPÍTULO III.

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol. ScienceDirect Journals*. 105: 121-126.
- Anila, L., Vijayalakshmi, N. R. 2003. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Emblica officinalis* in hypercholesterolemic rats. *Food chemistry*. 83(4): 569-574.
- Begrache, K., Massart, J., Robin, M. A., Bonnet, F., Fromenty, B. 2013. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 58(4): 1497-1507.
- 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.

- Dantoine, T. F., Debord, J., Charmes, J. P., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., Leroux-Robert, C. 1998. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 9(11): 2082-2088.
- Demir, Y., Oruç, E., Topal, A. 2016. Carbonic anhydrase activity responses and histopathological changes in gill and liver tissues after acute exposure to chromium in brown trout juveniles. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 44(4): 515-523.
- Giannopolitis C.N, Reis S.K. 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*. 59: 309-314.
- Houten, S. M., Wanders, R. J. 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*. 33(5): 469-477.
- Jimoh, A., Tanko, Y., Ahmed, A., Mohammed, A., Ayo, J. O. 2018. Resveratrol prevents high-fat diet-induced obesity and oxidative stress in rabbits. *Pathophysiology*. 25(4): 359-364.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*. 89(3): 217-233.
- Kumar, S., Kumar, V., Prakash, O. 2011. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic potential and histopathological analysis of ethyl acetate fraction of *Callistemon lanceolatus* leaves extract on alloxan induced diabetic rats. *Journal of Experimental & Integrative Medicine*. 1(3).
- López-Mejía, A. 2018. Efecto protector del extracto de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido en rata. Tesis de Maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
- López-Mejía, A., Ortega-Pérez, L. G., Godinez-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.

- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Arrigo, T. 2015. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences*. 16(1): 378-400.
- 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(17): 1-8.
- Petronilho, S., Rocha, S. M., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Rios-Chavez, P. 2013. Assessment of the terpenic profile of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels from Mexico. *Industrial crops and products*. 46: 369-379.
- Prabhu, K.S., Reddy, P.V., Gumpricht, E., Hildenbrandt, G.R., Scholz, R.W., Sordillo, L.M., Reddy, C.C. 2001. Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochemical Journal*. 360: 345-354.
- Radulović, N. S., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Cakić, N. D., Bogdanović, G. A., Živanović, A. V. 2015. Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from Crimson Bottlebrush flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. *Food Research International*. 77: 280-289.
- Sampath, S., Kalimuthu, B., Veeramani, V., Janardhanam, S., Baran, M. A., Chellan, R. 2016. Evaluation of total antioxidant and free radical scavenging activities of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels extracts by biochemical and electron paramagnetic resonance analyses. *RSC Advances*. 6(15): 12382-12390.
- Sampath, S., Veeramani, V., Krishnakumar, G. S., Sivalingam, U., Madurai, S. L., Chellan, R. 2017. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1, 8-Cineole-containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 93: 296-307.
- Spitz, D., Sullivan, S. J., Malcolm, R. B. Roberts, R. J. 1991. Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine*. 11(4): 415-424.

7. Discusión General

Los efectos de la obesidad han sido ampliamente estudiados en animales de experimentación. Sin embargo, hay poca información disponible sobre los parámetros morfométricos en ratas, el perfil bioquímico y el estrés oxidativo en ratas (Novelli *et al.*, 2007). De esta forma dentro de los reportes existentes sobre el estudio de la obesidad y el estrés oxidativo, se analiza en la mayoría de investigaciones los efectos en las enzimas y biomarcadores de estrés oxidativo en el hígado, por lo que existen escasos reportes del corazón y sus sistemas antioxidantes durante la obesidad.

El presente estudio demostró los efectos anti-obesogénico y antioxidantes del extracto etanólico de hoja de *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels en el hígado y corazón por la obesidad inducida por una dieta alta en grasas en ratas Wistar. Se ha mencionado que el extracto de hoja de *C. citrinus* no suprime la ingesta de calorías en ratas (López-Mejía *et al.*, 2019). Los compuestos de *C. citrinus* bioactivos tienen una alta eficacia para prevenir la obesidad mediante la inhibición de las enzimas clave y los estimulantes fitoconstituyentes del extracto frente al estrés oxidativo. La hoja de *C. citrinus* tiene capacidad inhibidora de la α -glucosidasa para reducir la absorción de carbohidratos y la producción de glucosa gastrointestinal (Fayemi *et al.* 2019). Quiroga *et al.*, (2013) reporta que el extracto de *Lippia turbinata*, presenta una actividad anti-lipasa, cabe mencionar que la composición de los fitoquímicos mayoritarios de *L. turbinata* es similar a la de *C. citrinus*. Por lo tanto, los extractos de *C. citrinus* podrían tener un efecto sobre las enzimas clave relacionadas con la obesidad, modulando el metabolismo de las grasas y carbohidratos para una reducción significativa del peso corporal como lo confirman nuestros resultados de los parámetros morfométricos, la disminución significativa del índice de adiposidad e índice Lee.

Por otro lado, ya se ha mencionado que, durante el consumo de dietas hipercalóricas, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres que inducen al estrés oxidativo (Houten y Wanders, 2010; Begriche *et al.*, 2013). Una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) tiene efectos perjudiciales sobre los hepatocitos al dañar el ADN, los lípidos y las proteínas, lo que provoca interrupciones en

la homeostasis celular y agrava las características de la obesidad (Kohen y Nyska, 2002; Matsuda y Shimomura, 2013). Por lo tanto, las ratas tratadas con hoja de *C. citrinus* estaban protegieron contra la oxidación en el hígado y corazón. También, los fitoquímicos como el 1,8-cineol, limoneno, α -terpineol y α -pineno presentes en la hoja de extracto de *C. citrinus* (Petronilho *et al.*, 2013; Sampath *et al.*, 2017) actúan sinérgicamente para mejorar el balance antioxidante con las enzimas SOD, CAT y GPx, este efecto podría estar asociado por la formación de inhibición de radicales libres que modulan la actividad de eliminación de radicales que previenen el estrés oxidativo. Estos fitoquímicos desempeñan el papel de antioxidantes para prevenir el estrés oxidativo como se informó anteriormente en la evaluación del antioxidante total de los extractos de *C. citrinus* (Curtis) Skeels (Sampath *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, *C. citrinus* tiene mecanismos potenciales de desintoxicación de antioxidantes al regular las actividades de la enzima PON1 y la fase II de la enzima GST, este efecto podría atribuirse a la inhibición de la formación de moléculas electrofílicas. En este sentido, estudios previos se ha reportado que *C. citrinus* tiene la capacidad de inducir mecanismos de detoxificación enzimática (Lopez-Mejia *et al.*, 2019) y antioxidantes (Kumar *et al.*, 2011; Sampath *et al.*, 2016), propiedades, que podrían contribuir a la buena salud del hígado y corazón en condiciones de obesidad en rata. Entonces *Callistemon citrinus* al restaurar las actividades enzimáticas a niveles basales, podría ser la razón principal para controlar los niveles celulares de MDA, HNE y PCO.

El potencial de los fitoquímicos antioxidantes de *C. citrinus* junto con la participación de GSH para disminuir ROS manteniendo un equilibrio redox al interactuar con ROS, de esta *C. citrinus* mantuvo la concentración normal de ROS por la alta capacidad antioxidante (Sampath *et al.*, 2016; Lopez-Mejia *et al.*, 2019) y disminuyó los riesgos de complicaciones oxidativas en la obesidad (Marseglia *et al.*, 2015) como se observó en las ratas tratadas con *C. citrinus*

8. Conclusión General

En conclusión, este estudio demostró la eficacia del extracto etanólico de las hojas de *Callistemon citrinus* mediante la atenuación del aumento de peso corporal, que incluye la disminución de los parámetros morfométricos (circunferencia abdominal, aumento de peso corporal, IMC, índice de adiposidad e índice de Lee) que indican obesidad. *Callistemon citrinus* tiene una alta actividad antioxidante sobre el estrés oxidativo en animales con obesidad, restaurando vía inducción las actividades enzimáticas (SOD, CAT, GPx, GST y PON1) y contenido de glutatión reducido, así como la inhibición de la formación de productos altamente oxidativos como MDA, 4-HNE y PCO. Por lo tanto, la hoja de *C. citrinus* podría ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de esta afección y los procesos relacionados con la obesidad durante el estrés oxidativo.

Se recomienda más investigación para dilucidar los mecanismos de los compuestos con propiedades farmacológicas de *C. citrinus* en las rutas bioquímicas y moleculares en el proceso de obesidad.

9. Mecanismo de acción sugerido por *Callistemon citrinus* en la obesidad

El mecanismo de protección del sistema enzimático antioxidante y ciertos fitoquímicos de *C. citrinus* pueden probablemente ayudar a regular las enzimas antioxidantes por medio de la disminución de radicales libres.

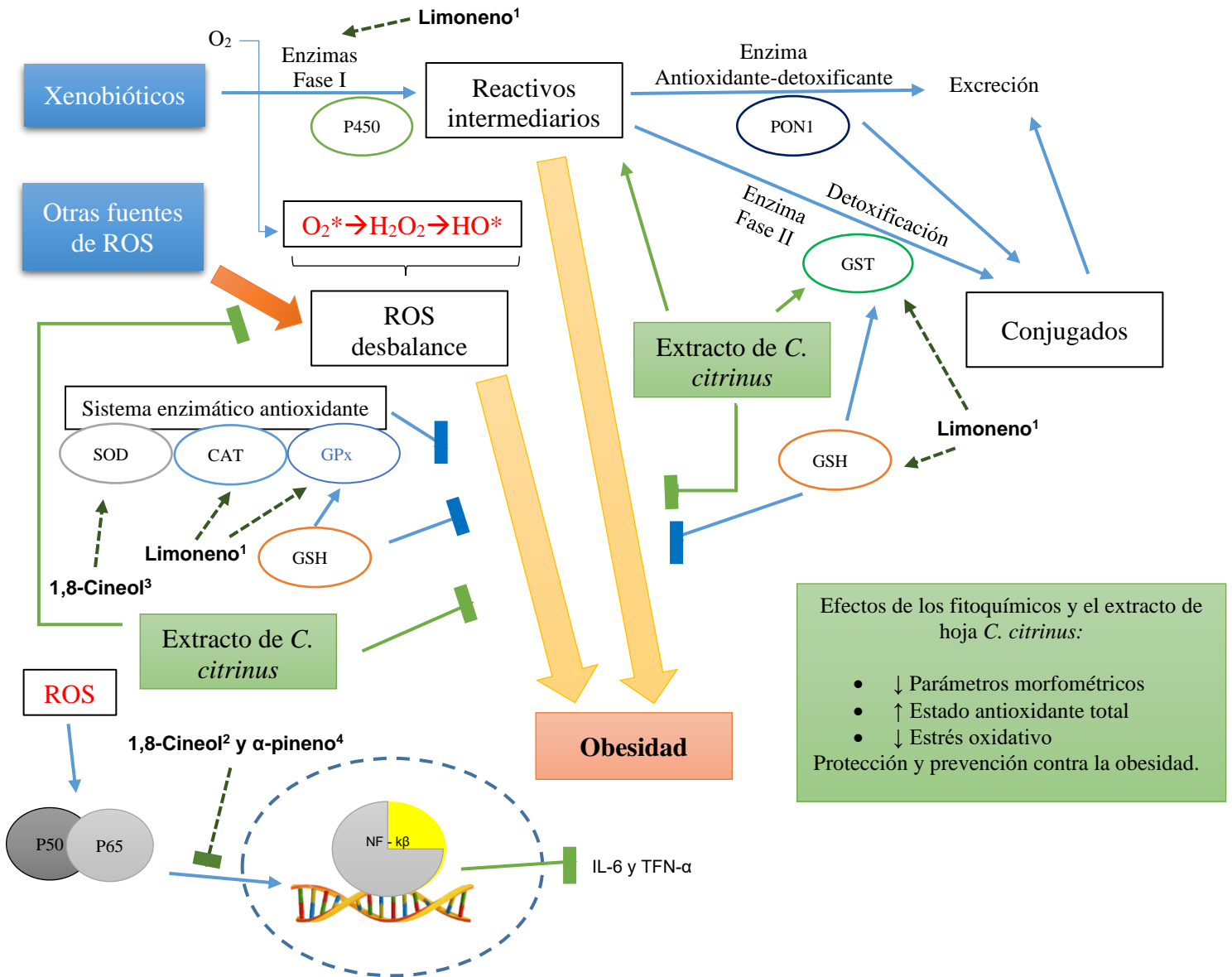


Figura 14. Esquema del posible mecanismo de acción del extracto etanólico de hojas de *C. citrinus* y sus fitoquímicos mayoritarios en condiciones de obesidad. Elaborado de acuerdo a los procesos generales descritos para el extracto de hoja de esta planta y sus compuestos mayoritarios (¹Chaudhary *et al.*, 2012; ²Greiner *et al.*, 2013; ³Ryu *et al.*, 2014; ⁴Kim *et al.*, 2015; López-Mejía *et al.*, 2019).

Además, de una posible implicación del extracto de hoja de *C. citrinus* y el glutatión en la neutralización de reactivos intermediarios (MDA, HNE y PCO), especies reactivas de oxígeno (GST y PON1). Por lo que *Callistemon citrinus* es responsable de ayudar a mantener el equilibrio redox interactuando directa o indirectamente con las ROS, y también está involucrado junto con el GSH en la desintoxicación de xenobióticos y promoción del flujo oxidante de lípidos (GST y PON1) ya sea a través de interacciones directas o mediante una acción concomitante con las enzimas. De esta manera se sugiere la relación del extracto de hoja de *C. citrinus* y la inhibición del desarrollo patológico y el papel potencial de los diferentes fitoquímicos (fig. 14).

10. Literatura Complementaria

- Ahmed, F., and Rahman, M. S. 2016. Preliminary assessment of free radical scavenging, thrombolytic and membrane stabilizing capabilities of organic fractions of *Callistemon citrinus* (Curtis.) skeels leaves. BMC complementary and alternative medicine. 16(1): 247.
- Ahmed, R., Tariq, M., Ahmad, I. S., Fouly, H., Hasan, A., Kushad, M. 2019. Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles Loaded with *Callistemon citrinus* Phenolics Exhibited Anticancer Properties against Three Breast Cancer Cell Lines. Journal of Food Quality. 2019.
- Alaminos-Castillo, M. Á., Ho-Plagaro, A., García-Serrano, S., Santiago-Fernandez, C., Rodríguez-Pacheco, F., Garrido-Sanchez, L., Rodríguez-Cañete, A. 2019. Increased PON lactonase activity in morbidly obese patients is associated with impaired lipid profile. International journal of clinical practice. 73(6): e13315.
- 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.
- Bais, S., Singh, G. S., Sharma, R. 2014. Antiobesity and hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* leaves against high fat diet-induced obesity in rats. Advances in Biology, 2014.
- Begrliche, K., Massart, J., Robin, M. A., Bonnet, F., Fromenty, B. 2013. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 58(4): 1497-1507.
- Bellosta, S., Bernini, F., Paoletti, R., Corsini, A. 2000. Non-lipid-related effects of statins. Annals of medicine. 32(3): 164-176.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S. E. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiological reviews. 94(2): 329-354.
- Blum, C. B. 1994. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. American Journal of Cardiology. 73(14): D3-D11.

- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*. 128(3): 617-630.
- Briskin, D. P. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology*. 124(2): 507-514.
- Buchanan, B. B. 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2ª edición. John Wiley and Sons. 1132-1133 pp.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., Bollheimer, L. C. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of molecular endocrinology*. 36(3): 485-501.
- 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.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 15-25.
- Ceron, J. J., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A. 2014. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research*. 10 (1): 74.
- Cha, K. H., Song, D. G., Kim, S. M., Pan, C. H. 2012. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee, and gomchui (*Ligularia fischeri*) tea polyphenols during simulated digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60(29): 7152-7157.
- Chaudhary, S., Siddiqui, M., Athar, M., Alam, M. S. 2012. d-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis. *Human & Experimental Toxicology*. 31(8): 798-811.
- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A., Wittwer, F. G. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*. 33(3): 265-283.
- Costa, S., Reina-Couto, M., Albino-Teixeira, A., Sousa, T. 2016. Statins and oxidative stress in chronic heart failure. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 35(1): 41-57.
- Davignon, J. 2004. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 109 (23 suppl 1): III-39.

- DeLany, J. P., Windhauser, M. M., Champagne, C. M., Bray, G. A. 2000. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 72(4): 905-911.
- Demir, Y., Oruç, E., Topal, A. 2016. Carbonic anhydrase activity responses and histopathological changes in gill and liver tissues after acute exposure to chromium in brown trout juveniles. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 44(4): 515-523.
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., Netticadan, T. 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension*. 18(6): 655-673.
- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., Meydani, M. 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *The Journal of nutrition*. 139(5): 919-925.
- Estrella, E. 1995. Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas. TCA undp IDE FAO UNAMAZ DGIS. No. F40-12.
- 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.
- García, A. Á., Carril, E. P. U. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. 2(3).
- Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., Van Heek, M., Hwa, J. J. 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity research*. 10(9): 956-963.
- Goyal, P. K., Jain, R., Jain, S., Sharma, A. 2012. A Review on biological and phytochemical investigation of plant genus *Callistimon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(3): S1906-S1909.
- Greig, D. 1999. Field guide to australian wildflowers. New Holland Publishers. Sydney, Australia.
- Greiner, J. F. W., Müller, J., Zeuner, M. T., Hauser, S., Seidel, T., Klenke, C., Kaltschmidt, B. 2013. 1, 8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF-κB p65 and NF-κB-

- dependent transcriptional activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1833(12): 2866-2878.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. 2004. Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation*. 110(7): 856-861.
- Haque, M. E., Sultana, A., Shibib, B. A., Islam, M. M. 2012. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 11(1): 51-54.
- Hariri, N., Thibault, L. 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*. 23(2): 270-299.
- Hebert, J. R., Patterson, R. E., Gorfine, M., Ebbeling, C. B., Jeor, S. T. S., Chlebowski, R. T. 2003. Differences between estimated caloric requirements and self-reported caloric intake in the women's health initiative. *Annals of epidemiology*. 13(9): 629-637.
- Herbert, R. B. 1989. The biosynthesis of secondary metabolites. Springer Science and Business Media. 1-5 pp.
- Houten, S. M., Wanders, R. J. 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*. 33(5): 469-477.
- Jambocus, N.G.S., Ismail, A., Khatib, A., Mahomoodally, F., Saari, N., Mumtaz, M.W., Hamid, A.A. 2017. *Morinda citrifolia* L. leaf extract prevent weight in Sprague-Dawley rats fed a high fat diet. *Food & Nutrition Research*. 61:1-13.
- Kang, M. H., Park, W. J., Choi, M. K. 2010. Anti-obesity and hypolipidemic effects of *Lycium chinense* leaf powder in obese rats. *Journal of medicinal food*. 13(4): 801-807.
- Khanum, F., Anilakumar, K. R., Viswanathan, K. R. 2004. Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 44(6): 479-488.
- Kien, C. L., Bunn, J. Y., Ugrasbul, F. 2005. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *The American journal of clinical nutrition*. 82(2): 320-326.

- Kim, D. S., Lee, H. J., Jeon, Y. D., Han, Y. H., Kee, J. Y., Kim, H. J., Kim, S. J. 2015. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF- κ B pathway in mouse peritoneal macrophages. *The American journal of Chinese medicine*. 43(04): 731-742.
- 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.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*. 89(3): 217-233.
- Kumar, S., Kumar, V., Prakash, O. 2011. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic potential and histopathological analysis of ethyl acetate fraction of *Callistemon lanceolatus* leaves extract on alloxan induced diabetic rats. *Journal of Experimental & Integrative Medicine*. 1(3).
- Lachance, P., Bonnefoy, M., Draï, J., Kostka, T. 2002. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*. 31: 1174-84.
- Lastra, G., Manrique, C. M., Hayden, M. R. 2006. The Role of β -Cell Dysfunction in the Cardiometabolic Syndrome. *Journal of the cardiometabolic syndrome*. 1(1): 41-46.
- Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A. 2002. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 282(1): R46-R54.
- Li W, Asagami F, McTaggart F, Tasao P. 2002. Rosuvastatin inhibits monocyte/endothelial interactions in ApoE (-/-) mice. *Int J Clin Pract*. 24: 5.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*. 80(5): 780-787.
- López-Mejía A, Rios-Chavez P, Godínez-Hernández D, Nateras-Marín B: Hepatoprotective effect of *Callistemon citrinus* on paracetamol induced liver toxicity in rats. In: The 31th Congreso Nacional de Bioquímica. Aguascalientes, Mex. 2016: 1:86.
- López-Mejía, A. 2018. Efecto protector del extracto de *Callistemon citrinus* en un modelo de cáncer de colon inducido en rata. Tesis de Maestría. Facultad de Biología.

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.

- 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.
- Lushchak, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*. 224: 164-175.
- Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Arrigo, T. 2015. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences*. 16(1): 378-400.
- Martínez, G. C. 2016. Estudios fisicoquímicos y farmacobotánicos en algunas especies de asteráceas y rosáceas medicinales nativas. Tesis doctoral.
- 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.
- Mnafgui, K., Derbali, A., Sayadi, S., Gharsallah, N., Elfeki, A., Allouche, N. 2015. Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *Journal of food science and technology*. 52(7): 4369-4377.
- Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R., Elkhayat, E. S., El Dine, R. S. 2014. Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 52(2): 269-284.
- Montaño-Ñeco, Y. I. 2011. Determinación de la actividad antimicrobiana y de la composición química de *Callistemon citrinus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
- Moon, H. S., Lee, H. G., Choi, Y. J., Kim, T. G., Cho, C. S. 2007. Proposed mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chemico-biological interactions*. 167(2): 85-98.
- Musaad, S., Haynes, E. N. 2007. Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. *Epidemiologic reviews*. 29(1): 98-114.

- Nazreen, S., Kaur, G., Alam, M. M., Shafi, S., Hamid, H., Ali, M., Alam, M. S. 2012. New flavones with antidiabetic activity from *Callistemon lanceolatus* DC. *Fitoterapia*, 83(8): 1623-1627.
- 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(17): 1-8.
- Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Novelli Filho, J. L. V. B. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*. 41(1): 111-119.
- Ortega-Pérez, L. G. 2017. Efecto antioxidante del extracto de *Callistemon citrinus* sobre corazón y riñón en ratas tratadas con 1,2-dimetilhidrazina. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
- Perry, F., Hay, R. 1982. A field guide to tropical and subtropical plants. Van Nostrand Reinhold Company. 136 pp.
- Petronilho, S., Rocha, S. M., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Rios-Chavez, P. 2013. Assessment of the terpenic profile of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels from Mexico. *Industrial crops and products*. 46: 369-379.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30(1): 11-26.
- Pichersky, E., Gang, D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*. 5(10): 439-445.
- Pi-Sunyer, F. X. 2002. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity research*. 10(S12): 97S-104S.
- Pongchaidecha, A., Lailerd, N., Boonprasert, W., Chattipakorn, N. 2009. Effects of curcuminoid supplement on cardiac autonomic status in high-fat-induced obese rats. *Nutrition*. 25(7-8): 870-878.
- Quiroga, P. R., Grosso, N. R., Lante, A., Lomolino, G., Zygadlo, J. A., Nepote, V. 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum*

- vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. International Journal of Food Science & Technology. 48(3): 642-649.
- Radulović, N. S., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Cakić, N. D., Bogdanović, G. A., y Živanović, A. V. 2015. Aboriginal bush foods: A major phloroglucinol from Crimson Bottlebrush flowers (*Callistemon citrinus*, Myrtaceae) displays strong antinociceptive and anti-inflammatory activity. Food Research International. 77: 280-289.
- Ramos-Gomez M., Fernández Correa J., Hernández Rivera E., Arvizu Espinosa M. G., Mendoza-Diaz Sandra., Reynoso-Camacho R., Loarca-Piña F. Ma., Gallegos-Corona M. A. 2011. Efecto de plantas mexicanas sobre el desarrollo de cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas Sprague-Dawley. CIENCIA@UAQ. 4(2): 56-69.
- Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., Yadav, U. C. 2016. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. Life sciences, vol. 148: 183-193.
- Rathod, G. B., Parmar, P., Rathod, S., Parikh, A. 2016. Hazards of Free Radicals in Various Aspects of Health A Review. Journal of Forensic Toxicology and Pharmacology. 2014(3): 2 pp.
- Ray, P. D., Huang, B.-W., Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cellular Signalling. 24(5): 981-990.
- Reuter, T. Y. 2007. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. Drug discovery today: disease models. 4(1): 3-8.
- Ríos-Chávez, P., Perez-Gonzalez, J., Salgado-Garciglia, R., Ramirez-Chavez, E., Molina-Torres, J., Martinez-Trujillo, M., Carreon-Abud, Y. 2019. Antibacterial and cytotoxicity activities and phytochemical analysis of three ornamental plants grown in Mexico. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 91(2).
- Román, G. S., Calderín, A. J. P., Clapés Hernández, S., Romero, T. F., Egaña Morales, E. 2013. Standardization of model to induce obesity in rats. MediSur, 11(5): 569-573.
- Rosenson, R. S., Tangney, C. C., Casey, L. C. 1999. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. The Lancet. 353(9157): 983-984.

- Ryu, S., Park, H., Seol, G. H., Choi, I. Y. 2014. 1,8-Cineole ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced ischaemic injury by reducing oxidative stress in rat cortical neuron/glia. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 66(12): 1818-1826.
- Sampath, S., Kalimuthu, B., Veeramani, V., Janardhanam, S., Baran, M. A., Chellan, R. 2016. Evaluation of total antioxidant and free radical scavenging activities of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels extracts by biochemical and electron paramagnetic resonance analyses. *RSC advances*. 6(15): 12382-12390.
- Sampath, S., Veeramani, V., Krishnakumar, G. S., Sivalingam, U., Madurai, S. L., y Chellan, R. 2017. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1, 8-Cineole-containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 93: 296-307.
- Sanguigni, V., Pignatelli, P., Caccese, D., Pulcinelli, F., De Vito, F., Laur, R., and Violi, F. 2002. Atorvastatin decreases platelet superoxide anion production in hypercholesterolemic patients. *Eur Heart J*. 4: 372.
- Schwartz, J., Park, S. K., O'Neill, M. S., Vokonas, P. S., Sparrow, D., Weiss, S., Kelsey, K. 2005. Glutathione-S-transferase M1, obesity, statins, and autonomic effects of particles: gene-by-drug-by-environment interaction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 172(12): 1529-1533.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Dubey, N. K. 2012. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1, 8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*. 25(1): 27-33.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*. 82(2): 291-295.
- Sikaris, K. A. 2004. The clinical biochemistry of obesity. *The Clinical Biochemist Reviews*. 25(3): 165.
- Sirtori, C. R. 2014. The pharmacology of statins. *Pharmacological research*. 88: 3-11.
- Stancu, C., Sima, A. 2001. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of cellular and molecular medicine*. 5(4): 378-387.

- Storlien, L. H., Huang, X. F., Lin, S., Xin, X., Wang, H. Q., Else, P. L. 2001. Dietary fat subtypes and obesity. In *Fatty Acids and Lipids-New Findings*. Karger Publishers. 88:148-154.
- Sudhakar, M., Rao, C. V., Rao, A. L., Ramesh, A., Srinivas, N., Raju, D. B., Murthy, B. K. 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the standardized oil of Indian *Callistemon lanceolatus* leaves in experimental animals. *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7(1): 10-15.
- Sumitra, S. 2014. Genus *Callistemon*: an update review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(7): 291-307.
- Sun, N. N., Wu, T. Y., Chau, C. F. 2016. Natural dietary and herbal products in anti-obesity treatment. *Molecules*. 21(10): 1351.
- Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Sonta, T., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Nawata, H. 2005. Statin attenuates high glucose-induced and diabetes-induced oxidative stress in vitro and in vivo evaluated by electron spin resonance measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. 39(4): 444-452.
- Tung, Y-C., Hsieh, P-H., Pan, M-H., Ho, C-T. 2017. Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25: 100-110.
- Unger, RH. 2003. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*. 144: 5159-5165.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. 7(1): 65-74.
- Venereo-Gutiérrez, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*. 31(2): 126-133.
- Von-Diemen, V., Trindade, E. N., Trindade, M. R. M. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 21(6): 425-429.
- Voss, S., Kroke, A., Klipstein-Grobusch, K., Boeing, H. 1998. Is macronutrient composition of dietary intake data affected by underreporting? Results from the EPIC-Potsdam study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 52(2): 119-126.

- Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., Tso, P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition*. 133(4): 1081-1087.
- Young, G. S., Kirkland, J. B. 2007. Rat models of caloric intake and activity: relationships to animal physiology and human health. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*. 32(2): 161-176.
- Young, I. S., Woodside, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 54(3): 176-186.
- Yun, J. W. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review. *Phytochemistry*. 71(14-15): 1625-1641.

Sitios web

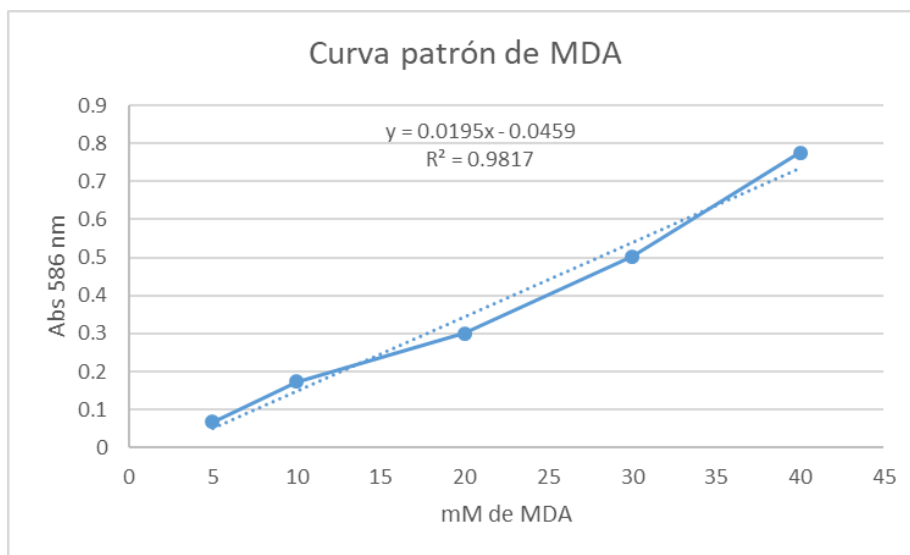
- Amancio-Chassin O., Ortigoza Ramírez J., Durante Montiel I. 2007. Obesidad. Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web: http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2007/may_01_ponencia.html. Último acceso: 22 de enero de 2019.
- Australian National Botanic Gardens. 2012. *Callistemon citrinus*. <https://www.anbg.gov.au/gnp/gnp2/callistemon-citrinus.html>. Último acceso: 28 de mayo de 2019.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT MC). 2016. Informe Final de Resultados. Sitio web: http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf. Último acceso: 5 de julio de 2018.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2018. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. Presentación de resultados. Sitio web: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ensanut/2018/doc/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf. Último acceso: 08 de enero de 2020.
- Missouri Botanical Garden. 2013. *Callistemon citrinus* (Ficha técnica). Sitio web: <http://www.tropicos.org/Name/22102190>. Último acceso: 8 de julio de 2018.
- Organización Mundial de la salud. 2016. Childhood overweight and obesity. Sitio web: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>. Último acceso: 6 de julio de 2018.

Organización Mundial de la salud. 2017. Obesidad y sobrepeso. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>. Último acceso: 5 de julio de 2018.

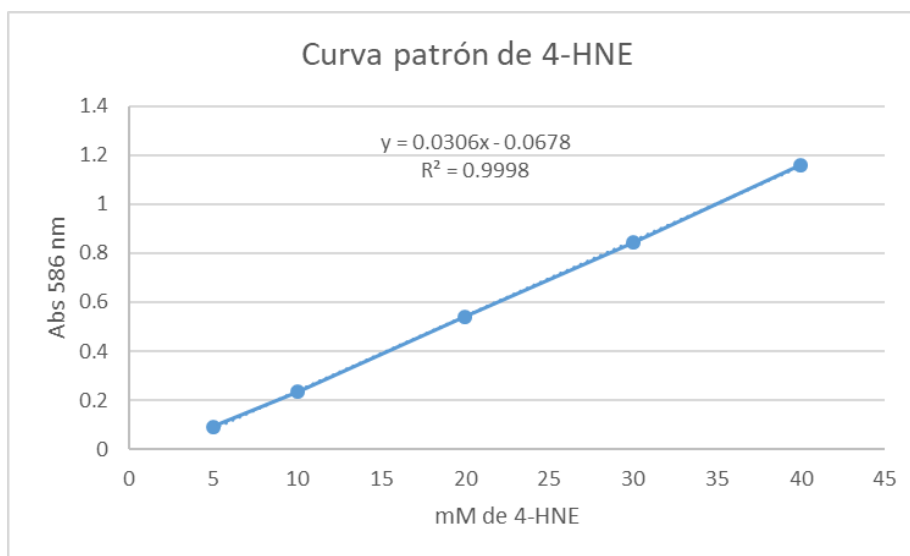
UNICEF (Fondo de las Naciones Unidas para la infancia). 2017. Informe Anual 2017. Sitio web: <http://www.unicef.org.mx/Informe2017/>. Último acceso: 5 de julio de 2018.

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 glutatión reducido (GSH).

