



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

## **CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA, UNIDAD QUERÉTARO**

### **POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA**

Tesis presentada para obtener el grado de:

***Doctorado en Tecnología Avanzada***

Título del trabajo de tesis:

**“Determinar el efecto antidiabético, y su probable mecanismo de acción, de plantas de uso cotidiano en la medicina tradicional”**

Presenta:

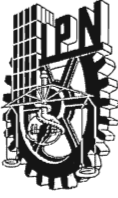
**M. en C. Ana Karen Castellanos Jiménez**

Directores de tesis:

**Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez**

**Dra. Rosalía Reynoso Camacho**

Santiago de Querétaro, Querétaro, junio 2022



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 4 de Junio del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-Qro. en su sesión ordinaria No. 180601 celebrada el día 1 del mes de Junio conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Castellanos</u>	<u>Jiménez</u>	<u>Ana Karen</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)

Con registro: 

A	1	8	0	5	6	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **DOCTORADO**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Determinar el efecto antidiabético, y su probable mecanismo de acción, de plantas de uso cotidiano en la medicina tradicional.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

1. Mediante un estudio controlado y utilizando un modelo animal de diabetes, determinar el efecto antidiabético de las plantas propuestas.
2. Determinar si alguna de las plantas tiene efectos fisiológicos adversos o tóxicos en el modelo propuesto.
3. Mediante técnicas bioquímicas y genéticas, postular el mecanismo de acción más probable para cada una de las plantas estudiadas como secreción de insulina, inhibición de gluconeogénesis y mejora de la respuesta a insulina en tejidos periféricos.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez (CICATA-IPN-QRO)  
Dra. Rosalía Reynoso Camacho (UAQ)

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en: CICATA-IPN-QRO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

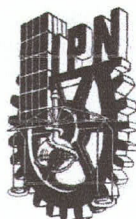
Directores de Tesis

\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez

\_\_\_\_\_  
M. C. Ana Karen Castellanos Jiménez

\_\_\_\_\_  
Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Presidente del Colegio

\_\_\_\_\_  
Dr. Alejandro Alfredo Lozano Guzmán



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Querétaro siendo las 11:00 horas del día 27 del mes de Junio del 2022 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CICATA-IPN UNIDAD QUERETARO para examinar la tesis titulada:

Determinar el efecto antidiabético, y su probable mecanismo de acción, de plantas de uso cotidiano en la medicina tradicional del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Castellanos	Apellido Materno:	Jiménez	Nombre (s):	Ana Karen
-------------------	-------------	-------------------	---------	-------------	-----------

Número de registro: A 1 8 0 5 6 4

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Tecnología Avanzada

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 18% de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI**  **NO**  **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:** En el análisis de similitud del documento de tesis no se detectaron frases completas idénticas a otras fuentes. Además, los porcentajes más altos de similitud que corresponden a palabras uso común en el tema de estudio o formato común que son empleados para citar las referencias.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:

El trabajo desarrollado cumple con los requisitos para proceder a sustentar el examen de grado al cual aspira

### COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz

Dra. Ma. Guadalupe del Carmen Méndez Montealvo

Dra. Regina Hernández Gama



Dr. Juan Bautista Hurtado Ramos  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES Y UNIDAD QUERETARO  
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN*

En la Ciudad de México el día 30 del mes de Junio del año 2022, la que suscribe **Ana Karen Castellanos Jiménez** alumna del programa de **Doctorado en Tecnología Avanzada**, con número de registro **A180564**, adscrita al **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, unidad Querétaro (CICATA-IPN-QRO)** manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del **Dr. Luis Miguel Rodríguez Salgado** y la codirección de la **Dra. Rosalía Reynoso Camacho** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Determinar el efecto antidiabético, y su probable mecanismo de acción, de plantas de uso cotidiano en la medicina tradicional”**, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o directores. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo electrónico: *krencastellanos89@gmail.com*, *lmsalgador@ipn.mx* o *rrcamachomx@yahoo.com.mx*. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

---

M. en C. Ana Karen Castellanos Jiménez

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional unidad Querétaro (CICATA-IPN-QRO), por abrirme sus puertas y permitirme estudiar en un Posgrado incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a lo largo de mi camino por el doctorado y a los “Proyectos de Investigación Científico y Desarrollo Tecnológico” y “Proyectos de Investigación en el Programa Especial de Consolidación de Investigadores” al cual agradezco por el financiamiento otorgado.

A mis directores de tesis, el Dr. Luis Miguel Salgado, por aceptarme en el programa de doctorado y por la orientación para la realización de este trabajo de investigación y a la Dra. Rosalía Reynoso por su orientación y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo en el Laboratorio de Bioquímica Molecular en la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), gracias a ello esta investigación fue posible.

A mi comité tutorial, el Dr. Gonzalo Velazquez, la Dra. Ma. Guadalupe Méndez y la Dra. Regina Hernández por las aportaciones científicas, correcciones y sugerencias durante los tan temidos tutoriales cada semestre y por supuesto durante la redacción de este trabajo. Agradezco a todos su reconocimiento y optimismo, que sin duda me motivaron a dar lo mejor de mí.

A la Dra. Ofelia Mora por brindarme la oportunidad de trabajar y aprender de ella y de su equipo de trabajo en el Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de la Universidad Autónoma de México (UNAM), por su amabilidad y hospitalidad que me hicieron sentir parte del equipo. Un especial agradecimiento a la M. en C. Laura González por su amistad, tiempo, dedicación, instrucción y profesionalismo, sin duda gracias a ti lo difícil se volvió fácil.

A la Dra. Flor González, técnico del UPLC-MS de la UAQ, gracias Florecita por tu amistad y por vivir conmigo cada una de las anécdotas buenas, malas y por que no divertidas en el Laboratorio Especializado en Análisis de Alimentos, sin duda lo hicieron más llevadero. Gracias por tu dedicación, tiempo y asesoramiento.

Al Dr. Adrián García por toda su comprensión, nobleza y apoyo cuando más abatida me sentía, motivándome a continuar.

Al Dr. Francisco de Moure por su amistad sincera y desinteresada, por escucharme y aconsejarme. Sin duda, sus anécdotas y consejos fueron un soporte constante.

A la Lic. Alicia Anaya por su nobleza, apoyo y amistad sincera y desinteresada a lo largo de mi camino como alumna de doctorado en CICATA.

A mis amigos y compañeros Julio, Ale, Miriam, Rudi (CICATA), Anita, Alex, Mariana, Yaz, Fernando, Hugo, Haiku, Joel, Yuri (UAQ), Carlos, Frida, Carol, Sarahi, Lucero (UNAM) por su hospitalidad, compañía, atención y amabilidad, por compartir su conocimiento y ser cómplices de momentos alegres, estresantes, divertidos y frustrantes en el laboratorio.

A Alejandra Ramírez, Ana Sanchis, Araceli Vargas, Israel Alcaraz y a todas las personas que de manera directa o indirecta hicieron posible la realización de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES Y DEDICATORIAS**

Sin duda un proyecto de investigación es un trabajo arduo y extenso, cuatro años no se agradecen tan fácilmente, por lo que quiero dedicar este apartado a todas esas personas maravillosas que me alentaron y contribuyeron personalmente y en gran medida a este capítulo de mi vida.

A mi familia, a mis padres, Ana Jiménez y Nahum Castellanos por ser promotores de mi formación académica, gracias por ser inspiración y un ejemplo a seguir, por el amor incondicional, por su apoyo y por anhelar siempre lo mejor para mi vida, por cada consejo y cada palabra. A mis hermanos Emmanuel y Jessica, gracias por estar, por sus bromas, por sus consejos, por motivarme a ser una mejor versión de mi y dar mi mejor esfuerzo. Soy afortunada de tenerlos.

A mi esposo, Rafael Olvera, no tengo palabras para agradecerte todo el amor y apoyo que me brindas día a día, por tu compañía en aquellas noches en el laboratorio, por ayudarme a cuidar ratitas, por esas noches de desvelo, de estrés, de frustración, en las que tus palabras fueron motivación para continuar y no darme por vencida. Gracias por ser un esposo comprensible, amoroso y trabajador.

A la memoria de mi abuelito J. Jesús Jiménez, quien siempre será inspiración de disciplina y constancia.

A Ángel Granados y a mis hermanitos de CICATA Julio Rubio y Alejandra Rangel, por su maravillosa amistad, me considero una persona afortunada por tener amigos como ustedes, gracias por escucharme y aconsejarme siempre. Por los conocimientos brindados desinteresadamente, sin duda fueron un soporte académico y emocional constante.

A mis frutitas hermosas Aura, Tere, Araceli, Karla, Ale R., Ale C., por hacer siempre mi carcajada más sonora, mi sonrisa más brillante y minimizar los momentos de estrés y frustración. Gracias amigas por ser inspiración y por formar parte de mi vida.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>20</b>
2.1. Diabetes mellitus .....	20
2.1.1. Diagnóstico de diabetes.....	21
2.1.2. Clasificación de diabetes.....	22
2.2. Obesidad y diabetes tipo 2.....	23
2.2.1. Etapa1: incremento progresivo del peso corporal. ....	23
2.2.2. Etapa 2: desarrollo de resistencia a insulina .....	24
2.2.3. Etapa 3: desarrollo de diabetes tipo 2 .....	26
2.3. Plantas medicinales como una alternativa natural para el control de enfermedades metabólicas .....	26
2.3.1. Plantas con potencial efecto benéfico a la salud.....	27
2.3.2. Posibles efectos adversos en el uso de plantas medicinales.....	29
2.4. Plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana.....	29
2.4.1. Wereke ( <i>Ibervillea sonora</i> ) .....	29
2.4.2. Muicle ( <i>Justicia spicigera</i> ) .....	32
2.4.3. Hierbabuena ( <i>Mentha spicata</i> L).....	34
2.4.4. Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) .....	35
2.5. Análisis metabolómico: herramienta para detectar cambios en el perfil metabólico .....	38
2.5.1 Flujo de trabajo en el análisis metabolómico .....	39



2.5.2	Metabólica y alteraciones metabólicas.....	40
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
5.1.	Objetivo general.....	43
5.2.	Objetivos específicos.....	43
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
6.1.	Material vegetal y preparación de las decocciones herbales.....	44
6.2.	Cuantificación de compuestos fenólicos totales de las decocciones herbales .....	45
6.2.1.	Compuestos fenólicos totales .....	45
6.2.2.	Flavonoides totales .....	45
6.2.3.	Antocianinas totales .....	46
6.2.4.	Proantocianidinas totales .....	46
6.3.	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos extraíbles mediante UPLC-PDA-ESI-QqQ en las decocciones herbales .....	47
6.4.	Evaluaciones <i>in vitro</i> .....	48
6.4.1.	Capacidad de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa de las decocciones herbales	48
6.4.2.	Capacidad de inhibición de la enzima lipasa pancreática de las decocciones herbales.....	49
6.5.	Material biológico.....	49
6.6.	Evaluación del efecto de las decocciones herbales en un modelo <i>in vivo</i> ..	50
6.6.1.	Grupos de experimentación .....	50

6.6.2. Prueba de tolerancia oral a la glucosa .....	51
6.6.3. Sacrificio.....	51
6.7. Evaluación de los efectos de las decocciones herbales en ratas obesas inducidas con una dieta hipercalórica .....	52
6.7.1. Cuantificación del perfil lipídico en suero .....	52
6.7.2. Cuantificación de glucosa, insulina en suero y cálculo del índice HOMA-IR.....	52
6.7.3. Análisis histopatológico en hígado y tejido adiposo .....	53
6.7.4. Cuantificación de triglicéridos en hígado.....	53
6.7.5. Cuantificación de triglicéridos en heces .....	54
6.8. Evaluación de los efectos adversos por el consumo de las decocciones herbales en ratas alimentadas con dieta estándar .....	54
6.8.1. Análisis histopatológico y mediciones histomorfométricas en hígado, riñones y colon .....	54
6.8.2. Cuantificación de parámetros relacionados con daño hepático .....	55
6.8.3. Cuantificación de parámetros relacionados con daño renal.....	56
6.9. Determinación de la expresión relativa de genes por RT-qPCR.....	56
6.9.1. Extracción de RNA y síntesis de ADNc.....	56
6.9.2 Análisis RT-qPCR .....	57
6.10. Análisis metabolómico en tejido hepático por UPLC/QTOF-MS .....	57
6.10.1. Preparación del extracto hepático.....	57
6.10.2. Método cromatográfico.....	59
6.10.3. Espectrometría de masas .....	59
6.10.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico .....	60

6.11. Análisis estadístico .....	61
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
7.1. Análisis de compuestos fenólicos totales e identificación y cuantificación de compuestos empleando UPLC-PDA-ESI-QqQ de cada decocción herbal.....	62
7.2. Efecto de las decocciones herbales sobre el control de obesidad inducido por dieta en un modelo <i>in vivo</i> . .....	67
7.2.1. Efecto de las decocciones herbales sobre el peso corporal y el consumo de alimento .....	67
7.2.2. Almacenamiento de lípidos y morfología del tejido adiposo visceral.....	71
7.2.3. Almacenamiento de grasa en el tejido hepático.....	73
7.2.4. Perfil de lípidos en suero.....	74
7.2.5. Capacidad de inhibición de la lipasa pancreática de las decocciones herbales	76
7.2.6. Inhibición <i>in vitro</i> de la $\alpha$ -amilasa .....	77
7.2.7. Efecto sobre la homeostasis de glucosa .....	78
7.3. Efecto de las decocciones herbales sobre las expresiones relativa de genes .....	83
7.3.1. Genes relacionados con la vía gluconeogénica .....	83
7.3.2. Genes relacionados con la cascada de señalización de la insulina .....	85
7.4. Efecto del consumo de las decocciones herbales sobre parámetros de daño en ratas alimentadas con dieta estándar .....	86
7.4.1. Peso corporal, consumo de alimento y morfología del tejido adiposo.....	86
7.4.3. Efecto sobre la homeostasis de glucosa y los niveles de triglicéridos en suero	89
7.4.4. Efecto de las decocciones de hierbas en la necrosis de las células hepáticas y el daño por colestasis .....	91

7.4.5. Efecto de las decocciones herbales en los parámetros de la función renal .....	97
7.4.6. Efecto de las decocciones de hierbas en el daño del colon .....	102
7.5. Análisis metabolómico en el tejido hepático de los animales de estudio...	104
7.5.1. Análisis metabolómico en hígado de ratas control y ratas obesas tratadas con las decocciones herbales.....	106
7.5.2. Análisis metabolómico en hígado de ratas alimentadas con dieta estándar y tratadas con las decocciones herbales.....	111
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diez primeros países o territorios con mayor cantidad de adultos con diabetes.....	21
Figura 2. Wereke ( <i>Ibervillea sonora</i> ).....	30
Figura 3. Muicle ( <i>Justicia spicigera</i> ).....	32
Figura 4. Hierbabuena ( <i>Mentha spicata</i> ).....	34
Figura 5. Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	35
Figura 6. Ganancia en peso corporal del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales. ....	68
Figura 7. Consumo de alimento (A) y energía (B) del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales.. ....	70
Figura 8. Micrografías representativas de secciones de tejido adiposo visceral (X40). (A) Efecto de las decocciones herbales sobre la B) hipertrofia e C) hiperplasia en adipocitos del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales. ....	72
Figura 9. A) Micrografías representativas de secciones de tejido hepático (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre el B) contenido de triglicéridos en hígado de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. ....	74
Figura 10. Efecto de las decocciones herbales sobre la inhibición de la lipasa pancreática (A) y sobre el contenido de triglicéridos en heces (B). ....	76
Figura 11. Capacidad de inhibición in vitro de la enzima $\alpha$ -amilasa por las decocciones herbales. ....	78
Figura 12. Curva de tolerancia oral a la glucosa de los grupos controles ..	79

Figura 13. Prueba de tolerancia a la glucosa de grupos control y grupos tratados con las decocciones herbales. ....	79
Figura 14. Expresión relativa de genes gluconeogénicos en tejido hepático. *Indica diferencia estadística con respecto al grupo control.. ....	84
Figura 15. Expresión relativa de genes relacionados con la cascada de señalización de insulina en tejido adiposo.....	85
Figura 16. Ganancia de peso corporal en grupos alimentados con dieta comercial y tratados con las diferentes decocciones herbales.. ....	87
Figura 17. Consumo de A) alimento y B) energía en grupos alimentados con dieta comercial y tratados con las diferentes decocciones herbales.....	88
Figura 18. A) Micrografías representativas de secciones de tejido adiposo visceral (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre la B) hipertrofia e C) hiperplasia en adipocitos de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. ....	88
Figura 19. Efecto de las decocciones herbales sobre la prueba de tolerancia a la glucosa en grupos alimentados con dieta comercial.....	90
Figura 20. Pesos A) relativos y B) absolutos del hígado y C) contenido de triglicéridos hepáticos en grupos alimentados con dieta comercial y decocciones herbales. ....	92
Figura 21. Micrografías representativas de secciones de tejido hepático (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre la A) morfología de los hepatocitos y B) la triada del portal de grupos alimentados con dieta comercial. .	93
Figura 22. Efecto de las decocciones herbales sobre la peroxidación de lípidos (A) y oxidación de proteínas (B) en hígado de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales.. ....	97

Figura 23. Pesos A) relativos y B) absolutos de riñones en ratas alimentados con dieta comercial y decocciones herbales..	98
Figura 24. A) Micrografías representativas de secciones de tejido renal (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre el B) área glomerular y C) el espacio de Bowman de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales.	98
Figura 25. Efecto de las decocciones herbales sobre la oxidación de proteínas en riñón de ratas control y ratas tratadas con las decocciones	102
Figura 26. Micrografías representativas de secciones de colon A) X10 y B) X40 de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales.	103
Figura 27. Efecto de las decocciones herbales sobre A) la túnica mucosa, B) la profundidad de la cripta y C) el número relativo de células caliciformes del tejido colónico de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales.	104
Figura 28. Análisis multivariante de componentes principales de los grupos de estudio. A) Modo positivo, B) Modo negativo.	105
Figura 29. Mapa de color A) Modo positivo, B) Modo negativo.	108
Figura 30. Análisis multivariado de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). A) Modo positivo, B) Modo negativo.	110
Figura 31. Diagrama de puntuación VIP de los metabolitos hepáticos de los grupos: control, obeso, obeso tratado con <i>I. sonorae</i> y obeso tratado con <i>H. sabdariffa</i> .	110
Figura 32. Mapa de calor de muestras individuales. A) modo positivo, B) modo negativo.	112
Figura 33. Análisis multivariado de discriminación de mínimos cuadrados parciales A) Modo positivo, B) Modo negativo.	114

Figura 34. A) Análisis multivariado de discriminación de mínimos cuadrados  
parciales (PLS-DA) y B) Diagrama de puntuación VIP de los metabolitos  
hepáticos. .... 114



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Gradiente empleado en el método cromatográfico para la determinación de compuestos fenólicos extraíbles .....	48
Cuadro 2. Composición de las dietas empleadas en el modelo <i>in vivo</i> .....	50
Cuadro 3. Grupos de experimentación .....	51
Cuadro 4. Características de genes endógenos y genes problemas empleados .....	58
Cuadro 5. Gradiente empleado en el método cromatográfico para el análisis metabólico.....	59
Cuadro 6. Compuestos fenólicos en las decocciones herbales .....	64
Cuadro 7. Niveles séricos de triglicéridos, colesterol total y HDL-c de los animales de estudio. ....	75
Cuadro 8. Niveles séricos de glucosa, insulina y cálculo del índice HOMA-IR .....	81
Cuadro 9. Efecto de las decocciones herbales sobre los niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos e índice HOMA-IR de ratas alimentadas con dieta estándar.....	90
Cuadro 10. Parámetros relacionados con alteraciones de células hepáticas de ratas alimentadas con dieta estándar y decocciones herbales .....	94
Cuadro 11. Parámetros relacionados con colestasis en células hepáticas de animales tratados con dieta estándar y decocciones herbales .....	94
Cuadro 12. Parámetros de daño renal de ratas alimentadas con dieta estándar y decocciones herbales .....	100

## ABSTRACT

In Mexico, plants such as *Ibervillea sonora*, *Justicia spicigera*, *Mentha spicata* or *Hibiscus sabdariffa* are used in the form of decoctions by the Mexican population to prevent or treat metabolic diseases such as obesity and diabetes. However, scientific evidence about its beneficial effect on health is still in process. In addition, the consumption of these medicinal plants could produce side effects. In this work, the therapeutic effects of individual decoctions of these four plants on obesity and its complications were evaluated in an *in vivo* model of obesity induced with a hypercaloric diet, and the possible adverse effects caused by their prolonged consumption in rats fed a commercial diet. Phenolic compounds from each decoction were identified and quantified by UPLC-PDA-ESI-QqQ. The effects of these decoctions were evaluated in diet-induced obese rats on insulin resistance, glucose tolerance, hypertriglyceridemia, as well as lipid storage in liver and adipose tissue by biochemical assays and histological analyses. Treatments that generated a positive effect on the parameters described above were selected to evaluate their possible mechanisms of action using RT-qPCR and metabolomic analysis (UPLC/QTOF-MS). Finally, tissues such as: liver, kidney and colon were examined to evaluate various parameters that allow detecting possible side effects from the consumption of these decoctions in rats that consumed a commercial diet. UPLC-PDA-ESI-QqQ analysis revealed that caffeoylquinic acid derivatives are the most abundant phenolic compounds in the decoctions. *H. sabdariffa* consumption prevented body weight gain, improved glucose homeostasis, and decreased adipocyte hypertrophy in obese rats. Whereas the consumption of *I. sonora* decreased the levels of triglycerides and glucose in rats fed a hypercaloric diet. Therefore, these decoctions (*I. sonora* and *H. sabdariffa*) were selected, and it was confirmed that 12 weeks of treatment were sufficient to create a change in the metabolic profile, which could indicate a regulation of the metabolites and be associated with an effect positive about health. On the other hand, no morphological changes were found in the organs evaluated with the consumption of herbal decoctions in rats fed a commercial diet. Therefore, treatments with *H. sabdariffa* or *I. sonora* decoctions improving glucose homeostasis and triglyceride levels of obese rats and no adverse effects were observed during their consume. The consumption of these decoctions could provide positive effects and be useful for the treatment of metabolic diseases such as obesity and its complications.

## RESUMEN

En México, plantas como *Ibervillea sonora*, *Justicia spicigera*, *Mentha spicata* o *Hibiscus sabdariffa* se utilizan en forma de decocciones por la población mexicana para prevenir o tratar diversas enfermedades como la obesidad y la diabetes. Sin embargo, la evidencia científica a cerca de su efecto benéfico en la salud aún está en proceso. Además, el consumo de dichas plantas medicinales podría producir efectos colaterales. En este trabajo se evaluaron los efectos terapéuticos de las decocciones individuales de estas cuatro plantas sobre la obesidad y sus complicaciones, en un modelo *in vivo* de obesidad inducido con dieta hipercalórica, y se evaluaron los posibles efectos adversos provocados por el consumo prolongado de dichas decocciones en ratas alimentadas con una dieta comercial. Se identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos extraíbles de cada decocción por UPLC-PDA-ESI-QqQ. Los efectos de estas decocciones se evaluaron en ratas obesas inducidas por dieta sobre la resistencia a insulina, tolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, así como almacenamiento de lípidos en tejido hepático y adiposo mediante ensayos bioquímicos y análisis histológicos. Se seleccionaron los tratamientos que generaron un efecto positivo sobre los parámetros anteriormente descritos para evaluar sus posibles mecanismos de acción empleando RT-qPCR y análisis metabolómico (UPLC/QTOF-MS). Finalmente, se examinaron tejidos como: hígado, riñón y colon para evaluar diversos parámetros que permiten detectar posibles efectos colaterales por el consumo de dichas decocciones en ratas que consumieron dieta comercial. El análisis UPLC-PDA-ESI-QqQ reveló que los derivados del ácido cafeoilquínico son los compuestos fenólicos más abundantes en las decocciones. El consumo de *H. sabdariffa* previno el aumento de peso corporal, mejoró la homeostasis de glucosa y disminuyó la hipertrofia de adipocitos en ratas obesas. Mientras que, el consumo de *I. sonora* disminuyó los niveles de triglicéridos y glucosa en ratas alimentadas con una dieta hipercalórica. Por lo anterior, se seleccionaron dichas decocciones (*I. sonora* e *H. sabdariffa*) y se confirmó que 12 semanas de tratamiento fueron suficientes para crear un cambio en el perfil metabólico, lo que podría indicar una regulación de los metabolitos y asociarse a un efecto positivo sobre la salud. Por otro lado, no se encontraron cambios morfológicos en los órganos evaluados con el consumo de las decocciones herbales en ratas alimentadas con dieta comercial. Las decocciones de *H. sabdariffa* o *I. sonora* mejoraron la homeostasis de la glucosa y los niveles de triglicéridos sin que se observaran efectos adversos. El consumo de estas decocciones podría brindar efectos positivos a la salud y ser útil para el tratamiento de enfermedades metabólicas como la obesidad y sus complicaciones.

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el comité del Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), 537 millones de personas fueron diagnosticadas con esta enfermedad en 2021. Además, la diabetes es considerada una de las patologías que genera mayor gasto en el sector salud y México se encuentra entre los primeros diez países por gasto total en salud debido a la diabetes (IDF, 2021). Por lo que, comúnmente las personas buscan alternativas más económicas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), el 88% de los estados miembros recurren al uso de la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de salud (WHO, 2019). En México, 5% de los pacientes diabéticos emplean fármacos para el control de la enfermedad, mientras que el 2% recurre al uso de plantas medicinales y 93% utiliza una combinación de ambos. En la medicina tradicional mexicana, plantas como *Ibervillea sonorae*, *Justicia spicigera*, *Mentha spicata* L. o *Hibiscus sabdariffa* se utilizan comúnmente, debido a su bajo costo y fácil acceso, para tratar o prevenir enfermedades metabólicas (Johnson et al., 2006). Sin embargo, el consumo de plantas medicinales puede no cumplir con las expectativas de eficacia y seguridad para los consumidores. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de cada decocción individual para el control de la obesidad y sus complicaciones, como la resistencia a insulina, la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática inducida por una dieta hipercalórica y estudiar los cambios en el perfil metabólico, así como evaluar los posibles efectos adversos causados en hígado, riñones y colon. La presente investigación pretende identificar la efectividad y la seguridad de las terapias a base de las hierbas anteriormente mencionadas empleadas en México para el control de la obesidad y sus complicaciones.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por un aumento en los niveles de glucosa en sangre, aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficientemente esta hormona (WHO, 2019). La diabetes se ha convertido en un problema de salud pública que ha incrementado de forma alarmante en todo el mundo, se proyecta que las cifras incrementarán hasta 643 millones para el 2030, lo que representa el 11.3% de la población mundial. Además, se estima que el 94% de estos aumentos ocurrirán en países de ingresos medios-bajos (IDF, 2021). La diabetes es una enfermedad degenerativa que cuando no es controlada adecuadamente puede disminuir progresivamente el funcionamiento óptimo del tejido nervioso (neuropatías), la retina (retinopatía), provocar pérdida de visión e incluso ceguera, daños en riñón (nefropatía) e hígado (hígado graso no alcohólico) e infartos (cardiopatía), con un pronóstico letal si no se controla (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013).

En 2021, México se encontró entre los primeros diez países con el mayor número de adultos diagnosticados con diabetes (14.1 millones) (Figura 1) y se estima que los casos aumentarán para el 2045 (21.2 millones) (IDF, 2021). Durante el periodo de enero a junio de 2021, la diabetes ocupó la tercera causa de muerte en México. En este año, se registraron 579,596 defunciones en nuestro país en donde las principales causas de muerte fueron por COVID-19 (145,159 defunciones), enfermedades del corazón (113,899 defunciones) y diabetes mellitus (74,418 defunciones) (INEGI, 2022). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) describe un aumento de la prevalencia de diabetes con diagnóstico médico previo de 9.2% (2012) a 10.6% (2020) en la población mexicana (a partir de 20 años) (ENSANUT, 2021).

Es importante destacar que México se encuentra entre los primeros diez países de adultos con diabetes sin diagnosticar (aproximadamente 6.7 millones) (IDF, 2021). Se estima que aproximadamente el 30% de la población mexicana con diabetes desconoce su condición (ENSANUT, 2021).

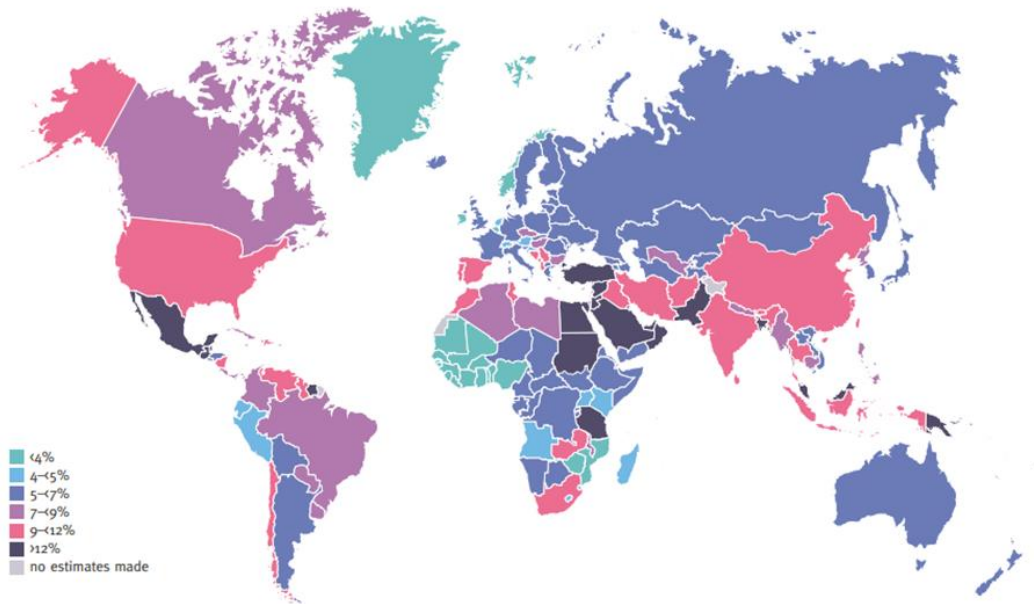


Figura 1. Diez primeros países o territorios con mayor cantidad de adultos con diabetes. Imagen tomada (IDF, 2021).

### 2.1.1. Diagnóstico de diabetes

La Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés), considera tres pruebas para el diagnóstico de diabetes:

*Glucosa plasmática en ayunas.* Esta prueba se realiza por lo menos con 8 h de ayuno antes del examen. Se considera que una persona es diabética cuando la glucosa plasmática en ayuno es  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L).

*Prueba de tolerancia oral a la glucosa.* Esta prueba tiene una duración, por lo general, de 2 h. Su finalidad es indicar como el cuerpo está procesando la glucosa. Se mide el nivel de glucosa en sangre antes y después de tomar una bebida azucarada. Se diagnostica diabetes cuando la glucosa en sangre a las 2 h es  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L).

*Prueba aleatoria de glucosa plasmática.* Esta prueba se puede realizar en cualquier momento, generalmente cuando el paciente presenta síntomas de diabetes. Se considera como paciente diabético cuando su glucosa en sangre es  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L).

Cuando la glucosa en sangre es mayor de lo normal pero no excede los niveles indicados en la parte superior, es decir, el paciente presenta una glucosa plasmática en ayuno de 100-125 mg/dL (6.1-6.9 mmol/L) o una glucosa en sangre a las 2 h después de la administración de una bebida azucarada, en la prueba oral de tolerancia a la glucosa de 140-199 mg/dL (7.8-11 mmol/L), se clasifica como prediabetes. Esto implica un riesgo en el desarrollo posterior de diabetes, así como de sus complicaciones (ADA, 2020; IDF, 2021).

### **2.1.2. Clasificación de diabetes**

La diabetes se clasifica, de manera general, en dos grupos: diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

La DMT1, también conocida como dependiente de insulina, usualmente presente en la infancia, representa entre el 5-10% de las incidencias de diabetes. Es una enfermedad autoinmune que resulta de la destrucción de las células  $\beta$ -pancreáticas, encargadas de la secreción de insulina, provocando una producción insuficiente de insulina. Los síntomas que caracterizan a la DMT1 son: sed excesiva (polidipsia), necesidad de orinar de forma frecuente (poliuria) y pérdida de peso. Sin embargo, muchas veces estos síntomas no se presentan y, por tanto, el diagnóstico puede retrasarse (Leitner et al., 2017). La DMT2, la forma más común de diabetes, representa a más del 90% de los pacientes diabéticos en todo el mundo. La DMT2 es causada por la incapacidad de las células de responder adecuadamente a la insulina, lo que se conoce como resistencia a insulina, así como por alteraciones en la capacidad de secretar insulina de forma aguda y sostenida. Los síntomas de la DMT2 pueden ser similares a los de la DMT1, sin embargo, es probable que no se detecten síntomas (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013).

## **2.2. Obesidad y diabetes tipo 2**

Las causas del desarrollo de DMT2 aún no se comprenden totalmente, sin embargo, existe una fuerte relación con el sobrepeso, la obesidad, una edad madura, el origen étnico y antecedentes familiares. De acuerdo con la Organización mundial de la salud, el 58% de los casos de diabetes son atribuibles a un índice de masa corporal (IMC) alto, por lo que se espera que la prevalencia de la diabetes relacionada con la obesidad se incremente (WHO, 2019). México ocupa el segundo lugar de prevalencia en obesidad, en donde la prevalencia combinada de sobrepeso (IMC 25 a 29.9 kg/m<sup>2</sup>) y obesidad (IMC≥30 kg/m<sup>2</sup>) fue de 72.1% en 2020 (ENSANUT, 2021). Los principales factores para el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones son el consumo de alimentos altos en calorías o grasas y una actividad física insuficiente, lo que favorece un equilibrio energético positivo y un aumento de peso (Leitner et al., 2017). La obesidad puede progresar a diabetes de forma rápida en individuos metabólicamente enfermos que muestran alteraciones en algunos marcadores metabólicos como: niveles de triglicéridos, lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL, respectivamente) y presencia de resistencia a insulina que puede ir acompañada de glucosa ligeramente elevada. Este proceso de evolución de la obesidad a la diabetes se divide en tres etapas metabólicas, las cuales son detalladas a continuación (García-Compeán et al., 2013).

### **2.2.1. Etapa1: incremento progresivo del peso corporal.**

En un estado postprandial, la insulina es una hormona que es secretada por las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a altos niveles de glucosa en sangre, proveniente de los alimentos. Dicha hormona promueve la utilización de glucosa para obtener energía (ATP) y llevar a cabo la síntesis de glucógeno (almacenamiento de glucosa) en hígado y músculo, además, estimula la captación de aminoácidos promoviendo la síntesis de proteínas (García-Compeán et al., 2013).



Cuando hay un excedente de glucosa, esta es transformada en ácidos grasos (AG) durante la lipogénesis. En un estado de obesidad, hay una mayor movilización y aumento de los niveles circulantes de AG. Además, el exceso de AG estimula la síntesis de triglicéridos (TG) en el tejido hepático y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Buettner et al., 2007). Los AG son esterificados en hígado para formar TG que asociados con la lipoproteína apoB100 son convertidos a VLDL y liberadas a circulación. Las VLDL interactúan con el HDL, encargado de transportar el exceso de colesterol de los tejidos periféricos al hígado, aportando a las VLDL apolipoproteínas y colesterol esterificado (transporte reverso del colesterol). En este estado, la insulina favorece la activación constante de la enzima lipoproteín lipasa (LPL), encargada de hidrolizar los TG en AG y glicerol. Los AG son reesterificados y almacenados en el tejido adiposo (TA), por lo que en esta etapa inicial se observa un incremento en el peso corporal, hay un aumento en el almacenamiento de TG en el TA, sin observar alteraciones en niveles de insulina, glucosa o lípidos. La duración de esta etapa depende de la capacidad de los adipocitos para almacenar los TG (genética, tasa de adipogénesis, lipogénesis, apoptosis, angiogénesis y la capacidad de expansión del adipocito: hipertrofia e hiperplasia). Además, es importante mencionar que cada adipocito tiene una morfología y función diferente dependiendo de su localización. El tejido adiposo visceral está fuertemente asociado con un mayor riesgo de desarrollo de DMT2 y dislipidemias (Lee, 2013; Longo et al., 2019).

### **2.2.2. Etapa 2: desarrollo de resistencia a insulina**

La resistencia a insulina se define como la disminución de la capacidad de la insulina para producir una respuesta fisiológica sobre el mantenimiento de la homeostasis de glucosa y sobre el metabolismo de lípidos y proteínas. La resistencia a insulina no solo es un factor importante que predispone el desarrollo de DMT2, sino también un componente importante de las enfermedades metabólicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares. Además, la resistencia a insulina ocurre localmente en tejidos que son sensibles a insulina (Longo et al., 2019; Petersen & Shulman, 2018).

A nivel celular, el deterioro de la señalización de insulina se presenta principalmente en hepatocitos, adipocitos, miocitos y células  $\beta$  pancreáticas (Lee, 2013).

Un incremento en la acumulación de TG en el tejido adiposo provoca un aumento en el tamaño de las células adiposas (hipertrofia), cuando el adipocito alcanza su capacidad de almacenamiento máximo y es forzado por la insulina para continuar almacenando TG de forma indefinida y descontrolada conducirá a una resistencia a insulina y un aumento en la sensibilidad a hormonas contrainsulínicas que activan la lipasa sensible a la hormona (LSH) encargada de regular la lipólisis, proceso que permite un vaciamiento parcial del adipocito enviando a circulación AG y glicerol. Sin embargo, cuando el adipocito vuelve a ser sensible a insulina y continúa siendo forzado a almacenar más TG sufre cambios morfológicos y funcionales que lo llevan a iniciar una respuesta proinflamatoria al secretar citocinas que promueven que el estado de resistencia a insulina se mantenga constante. En este estado ocurre una hiperinsulinemia compensatoria que contrarresta el efecto de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (García-Compeán et al., 2013; Lee, 2013; Petersen & Shulman, 2018).

Durante la resistencia a insulina, los AG generados por lipólisis estimulan inicialmente la secreción de insulina, sin embargo, a medida que incrementan generan toxicidad en las células  $\beta$  pancreáticas (lipotoxicidad) generando a largo plazo una disminución en la secreción de insulina. Se ha demostrado que algunos AG como el palmitato, tienen un efecto apoptótico sobre las células  $\beta$  pancreáticas, mientras que otros AG como el oleato protegen a la célula  $\beta$  pancreática (García-Compeán et al., 2013; Pillai & Mini, 2016).

Por otra parte, una secreción deficiente de insulina trae como consecuencia una disminución del número de transportadores de glucosa GLUT4 en el músculo esquelético y en las células adiposas impidiendo la captación de glucosa en tejidos dependientes de insulina, como consecuencia esto promueve una hiperglucemia sostenida (García-Compeán et al., 2013; Petersen & Shulman, 2018).

### **2.2.3. Etapa 3: desarrollo de diabetes tipo 2**

La glucotoxicidad y lipotoxicidad conducen a la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas, generando una producción deficiente de insulina y estableciendo la DM2. En este punto, no hay una respuesta eficiente a la insulina, por lo que se promueve la gluconeogénesis, producción hepática de glucosa a partir de aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas. En este punto disminuye la acción de la insulina y aumenta la acción de hormonas contraregulatorias que estimulan la lipólisis, lo que contribuye a la pérdida de peso corporal, factor observable en la DM. Además, al aumentar la lipólisis, aumenta la cantidad de AG que ingresan al hígado, por lo que estos son oxidados hasta acetil-CoA ( $\beta$ -oxidación), activando la producción descontrolada de glucosa (gluconeogénesis) y la formación de cuerpos cetónicos. La acumulación de AG en hígado provoca cambios en la morfología de los hepatocitos que van desde esteatosis, esteatohepatitis hasta cirrosis. Los AG que no son  $\beta$ -oxidados por el hígado, son reesterificados a TG y liberados a circulación en forma de VLDL, sin embargo, estas VLDL no son metabolizadas por la LPL debido a su composición (apo CIII es un inhibidor de LPL). Un reflejo de la acumulación de estas VLDL es un incremento en los niveles de TG plasmáticos (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal, 2013; García-Compeán et al., 2013; Petersen & Shulman, 2018).

### **2.3. Plantas medicinales como una alternativa natural para el control de enfermedades metabólicas**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el 80% de la población a nivel mundial hace uso frecuente de plantas medicinales para tratar diversas necesidades de salud (WHO, 2019). Además, es importante mencionar que México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en riqueza de plantas medicinales, en donde de las 3000 plantas registradas en el Herbario del IMSS a las 4500 especies estimadas de plantas con atributos medicinales, aproximadamente el 5% se han evaluado a nivel farmacológico (CONABIO, 2020).

### **2.3.1. Plantas con potencial efecto benéfico a la salud**

Un cambio en el estilo de vida y una reducción de grasa corporal son los enfoques principales empleados para prevenir la obesidad y sus complicaciones. Sin embargo, las restricciones de calorías y el aumento en la actividad corporal comúnmente son difíciles de lograr. Por lo anterior, algunos compuestos presentes en plantas con potenciales propiedades antiobesogénicas pueden proporcionar un efecto similar sin restringir la ingesta calórica (Bacanli et al., 2019; Ojulari et al., 2019). El uso potencial de plantas medicinales como agentes terapéuticos ha incrementado debido a la presencia de compuestos fenólicos en diversos preparados a base de estas plantas que, de acuerdo con numerosos estudios, confieren propiedades biológicas. De hecho, se ha reportado que los productos naturales y sus derivados representan más del 50% de los medicamentos de uso clínico a nivel mundial, donde las plantas aportan más del 25% principalmente por su contenido de compuestos fenólicos (Rodríguez-Pérez et al., 2019).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los principales grupos producidos por las plantas como metabolitos secundarios en condiciones normales o de estrés. La estructura de dichos compuestos se caracteriza por poseer uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo. Básicamente se clasifican en flavonoides (compuestos polifenólicos de quince carbonos con dos anillos aromáticos) y no flavonoides (principalmente ácidos fenólicos). Dentro de los compuestos fenólicos de interés destacan algunos ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianinas y antocianinas. Sin embargo, un efecto sinérgico parece ser el causante más probable de los efectos benéficos de los extractos herbales, dado que estos preparados suelen ser muy complejos (Bacanli et al., 2019; Rodríguez-Pérez et al., 2019). Si bien se han realizado estudios para estimar la cantidad de compuestos fenólicos recomendables en una ingesta dietética adecuada (25 a 30 mg/día), existen varios factores (cultivo, almacenamiento, métodos de extracción) que interfieren con la composición fenólica de los alimentos (Rodríguez-Pérez et al., 2019).

A pesar de que los efectos benéficos de las plantas pueden depender de varios factores (tiempo de cultivo, tipo de planta, tipo de extracto e incluso del modelo animal de estudio) se han propuesto algunos mecanismos para prevenir la obesidad a través de la ingesta de los polifenoles presentes en las plantas los cuales incluyen la disminución en la ingesta de alimentos, disminución de lipogénesis, aumento en la lipólisis, estimulación de la  $\beta$ -oxidación de AG, inhibición de la diferenciación y el crecimiento de los adipocitos, disminución de respuestas inflamatorias y supresión del estrés oxidativo (Rodríguez-Pérez et al., 2019).

La regulación del metabolismo de los TG depende de la actividad de enzimas lipolíticas, como la lipasa pancreática. Esta enzima cumple un papel importante en la digestión de los TG provenientes de la dieta. Una inhibición de dicha enzima provocaría que las grasas no se hidrolicen y se eliminen directamente en las heces. Por tanto, un potencial inhibidor de la lipasa pancreática es considerado un agente potencial contra la obesidad. Otro blanco importante para estudiar es la inhibición de la sintasa de AG, enzima encargada de sintetizar AG saturados a partir de acetil-CoA y malonil-CoA en presencia de NADPH. Por otro lado, inhibir la acción de enzimas digestivas como  $\alpha$ -amilasa, puede retrasar la digestión de carbohidratos y disminuir así la tasa de absorción de glucosa. Estudios han reportado que las catequinas, presentes en productos derivados del té, la canela o la cocoa, pueden interactuar con enzimas (lipasa pancreática y  $\alpha$ -amilasa) e inhibir su actividad (Rodríguez-Pérez et al., 2019).

Aunque los mecanismos de acción dependen del tipo de extracto y del modelo animal empleado, un efecto benéfico esperado es la reducción del peso corporal, así como una disminución del tejido graso y de la ingesta de energía (Bacanli et al., 2019). Otros efectos benéficos que se buscan con el consumo de extractos de plantas potenciales es mejorar el metabolismo de la glucosa, reduciendo sus niveles en sangre, así como mejorar dislipidemias, reduciendo los niveles de TG, colesterol y LDL. En la sección 2.4 se detallan los estudios realizados hasta el momento para las cuatro plantas de estudio propuestas en este trabajo.

### **2.3.2. Posibles efectos adversos en el uso de plantas medicinales**

El uso de medicamentos herbales es popular en muchos países, debido a que estos son asequibles, orientados al paciente y están estrechamente relacionados con la suposición de que una alternativa más “natural” es más segura que los medicamentos sintéticos. Las plantas medicinales contienen compuestos bioactivos que pueden tener efectos farmacológicos o bien efectos toxicológicos (Ojulari et al., 2019). Algunos de estos compuestos se han asociado con efectos adversos a la salud, dentro de los más graves reportados son daño hepático o renal, perforación del colon, carcinoma, coma y muerte (Ishtiaq et al., 2017; Posadzki et al., 2013).

La bioactividad asociada con beneficios a la salud comúnmente es atribuida a compuestos fenólicos identificados, sin embargo, los extractos herbales son mezclas complejas, en la que pueden estar presentes compuestos no deseados. Los compuestos derivados de la dieta generalmente se consideran seguros, sin embargo, estos compuestos podrían tener efectos nocivos en concentraciones farmacológicas, en determinadas poblaciones vulnerables o en algunas enfermedades. Además, se ha reportado el potencial prooxidativo de algunos compuestos fenólicos, que podría provocar toxicidad en hígado y riñón (Lambert et al., 2007). Entre los tejidos y órganos de los mamíferos, el hígado y el riñón parecen ser los predictores más sensibles de toxicidad. Esto se debe a su participación en el metabolismo, desintoxicación y almacenamiento. De hecho, se recomienda que los riñones y el hígado sean pesados y examinados histopatológicamente para detectar posibles efectos tóxicos (Craig et al., 2015).

## **2.4. Plantas empleadas en la medicina tradicional mexicana**

### **2.4.1. Wereke (*Ibervillea sonorae*)**

En la medicina tradicional mexicana, la raíz de *Ibervillea sonorae* Greene (Cucurbitaceae), coloquialmente conocida como “wereque” (Figura 2), es ampliamente utilizada como antibiótico, catártico, antirreumático y como hipoglucemiante (Rivera-Ramírez et al., 2011).

En México, la planta de *I. sonorae* es ampliamente considerada como un tratamiento empírico de la diabetes. Estudios han demostrado el potencial efecto hipoglucémico de varios miembros de la familia Cucurbitaceae, lo que sugiere cierta validación de su uso tradicional como remedio antidiabético (Semotiuk et al., 2020). *I. sonorae* es una planta que se distribuye en áreas semiáridas de los estados de Baja California, Sinaloa y Sonora en México (Hernández-Galicia et al., 2007).



Figura 2. Wereke (*Ibervillea sonorae*).

Previamente se han demostrado los efectos hipoglucémicos de extractos de metanol y diclorometano de *I. sonorae* en ratones sanos después una administración intraperitoneal, sin embargo, el extracto de diclorometano causó hipoglucemia grave y subsecuente muerte a los animales tratados. Por otro lado, cuando la administración se administró de forma oral a ratones diabéticos inducidos con alloxano, se observó una mejora en los niveles de glucosa, triglicéridos y peso corporal (Alarcon-Aguilar et al., 2005). Rivera-Ramírez et al. (2011) evaluaron el efecto del extracto acuoso de *I. sonorae* en un modelo *in vivo* de obesidad inducido por una dieta hipercalórica, observando una disminución del peso corporal, hiperglucemia e hipertrigliceridemia.

Sobre el mecanismo de acción, diversos autores sugieren que el efecto benéfico de *I. sonorae* podría estar relacionado con una mejora en la sensibilidad de insulina, captación de glucosa, producción de insulina o incluso con la inhibición de enzimas digestivas.

Un estudio reporta que al igual que la glibenclamida, bloqueador de los canales de potasio ATP dependientes, los extractos acuosos de *I. sonorae* podrían actuar como modulador de la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas. En ese sentido, se observó que *I. sonorae* estimuló la secreción de insulina en células  $\beta$ -pancreáticas RIN-m5F (Semotiuk et al., 2020). Además, un estudio empleando adipocitos humanos mostró que *I. sonorae* estimulaba la captación de glucosa mediante la activación de una vía independiente de PI3K (Zapata-Bustos et al., 2014). Por otra parte, Semotiuk et al. (2020) reportaron una inhibición competitiva de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, dependiente de la dosis. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados en estudios *in vivo*. Además, debido a que estos estudios varían ampliamente en las dosis, vías de administración, tipo de estudio e incluso forma de preparación del extracto, en este proyecto se planteó evaluar el efecto de una preparación tradicional de *I. sonorae* en un modelo animal de obesidad inducido por dieta.

Sobre su efecto adverso, estudios realizados con un extracto de diclorometano (DCM) de la raíz de *I. sonorae*, provocó hipoglucemia severa, convulsiones y subsecuente muerte cuando se administró intraperitonealmente a ratas diabéticas (Alarcon-Aguilar et al., 2005). El estudio realizado por Rivera-Ramírez et al. (2011) reveló un efecto aterogénico cuando el tratamiento se administró a ratones sin dieta hipercalórica. Otros estudios reportaron un efecto hipoglucémico dosis-dependiente en ratas Wistar y ratones CD1 sanos y diabéticos, sin reportar efectos tóxicos cuando se administró intraperitonealmente (850 mg/kg de peso corporal) u oralmente (2000 mg/kg de peso corporal) (Alarcon-Aguilar et al., 2002).

Hernández-Galicia et al. (2007) determinaron la dosis letal media para el extracto de DCM de *I. sonorae* administrado oralmente ( $LD_{50}=2158$  mg/kg) e intraperitonealmente ( $LD_{50}=425.4$  mg/kg) atribuyendo la letalidad a un efecto hipoglucémico severo. Son necesarios más estudios que determinen con más detalle el posible efecto adverso de esta planta de forma que avalen su uso terapéutico, especialmente de las preparaciones empleadas por la población.



Se ha propuesto que la presencia de dos mezclas de compuestos en el extracto de DCM (once monoglicéridos y cinco ácidos grasos) son responsables del efecto hipoglucémico de *I. sonorae* (Hernández-Galicia et al., 2007). Para los extractos acuosos, los efectos benéficos son atribuidos a la presencia de alcaloides, glucósidos, flavonas, saponinas esteroidales, esteroles, fenoles, triterpenos de cucurbitacina y otros triterpenos tetracíclicos, así como péptidos similares a insulina previamente reportados en la familia Cucurbitaceae (Semotiuk et al., 2020).

#### 2.4.2. Muicle (*Justicia spicigera*)

*Justicia spicigera* Schltld (Acanthaceae) es un arbusto de hoja perenne con flores tubulares de color naranja, conocido comúnmente como muicle (Figura 3), utilizado desde épocas prehispánicas hasta tiempos contemporáneos para curar enfermedades como la diabetes (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2014). *Justicia spicigera* crece en climas cálidos en México, en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luis Potosí, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán e Hidalgo (Ortiz-Andrade et al., 2012).



Figura 3. Muicle (*Justicia spicigera*).

Las hojas frescas de muicle tienen un color verde brillante, pero los extractos acuosos de las hojas producen un tono púrpura-rojizo intenso debido a la liberación de compuestos coloreados (Anaya-Esparza et al., 2018). Los principales compuestos encontrados en hojas frescas de *J. spicigera* fueron eucaliptol, fitol y azuleno, mientras que en hojas secas se encontraron fitol y ácidos linoleicos y oleicos (Baqueiro-Peña & Guerrero-Beltrán, 2014).

Ortíz-Andrade et al. (2012) reportaron un efecto hipoglucémico de extractos etanólicos de *J. spicigera*. Por otra parte, Sepúlveda-Jiménez et al. (2009) mostraron la capacidad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos obtenidos de las hojas, tallos y flores de *J. spicigera*. El extracto de *J. spicigera* empleando acetato de etilo disminuyó los marcadores de daño hepático relacionados con la integridad estructural del hígado como aminotransferasas (AST, ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT) en ratas con lesión hepática inducida con CCl<sub>4</sub> (Awad et al., 2015).

Sin embargo, se han reportado efectos adversos debidos a la ingesta de extractos etanólicos de *J. spicigera*, en donde se elevaron los niveles de urea en ratas normoglucémicas y aumentaron los niveles de triglicéridos en ratas diabéticas. Además, en el mismo estudio, se demostró que los extractos de hexano y acetato de etilo disminuyeron los niveles de colesterol y triglicéridos en ratas diabéticas. Sin embargo, aumentaron los niveles de creatinina en ratas normoglucémicas (Martínez-Mora et al., 2017).

Los efectos anteriormente mencionados son atribuidos a su contenido de polifenoles y capacidad antioxidante (Anaya-Esparza et al., 2018). En ese sentido, algunos de los compuestos encontrados en *J. spicigera* son compuestos fenólicos como kaemferol-3,7 bisrhamnosido (Kaempferitrin, KM), alantoina y criptoxantina (García-Márquez et al., 2012).

En un estudio se reportó un mayor contenido de compuestos fenólicos en extractos de *J. spicigera* empleando acetato de etilo comparado con los extractos de *J. spicigera* empleando etanol, éter de petróleo, cloroformo y butanol. Además, se identificaron por medio de HPLC, doce pigmentos de antocianina en la fracción de acetato de etilo (Awad et al., 2015). Sin embargo, no se tiene información sobre extractos acuosos, que es la preparación como las personas consumen comúnmente esta planta.

### 2.4.3. Hierbabuena (*Mentha spicata* L)

Comúnmente conocida como menta verde o hierbabuena, *Mentha spicata* (Lamiaceae) es consumida de manera muy común como infusión debido a su bajo costo y fácil acceso (Figura 4). Los efectos benéficos para la salud que se le atribuyen incluyen su uso como antiinflamatorio, antiséptico, digestivo y antioxidante (Ben Saad et al., 2018).



Figura 4. Hierbabuena (*Mentha spicata*).

En la medicina tradicional, la *Mentha spicata* es usada comúnmente en forma de té como remedio casero para ayudar a tratar espasmos musculares, dolor de cabeza, dolor de estómago, estimular la digestión, tratar la obesidad y otras enfermedades del sistema digestivo (Jamous et al., 2018). Los efectos terapéuticos son atribuidos a los principales compuestos bioactivos encontrados en extractos de *M. spicata*, los cuales incluyen ácidos fenólicos (rosmarínico, gálico, clorogénico y cafeico) y flavonoides (catequina, epicatequina, luteolina, quercetina, naringenina) (Bayani et al., 2017; Ben Saad et al., 2018; Fotakis et al., 2016).

Ensayos *in vitro* han demostrado que *M. spicata* inhibe la actividad de la lipasa pancreática y, por lo tanto, podría disminuir la degradación de triglicéridos y su absorción (Jamous et al., 2018). Por otra parte, estudios realizados con extractos acuosos de *M. spicata* en un modelo animal de diabetes, reportaron un efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico comparable con glibenclamida, un hipoglucemiante oral (Bayani et al., 2017).

Ben Saad et al. (2018) reportaron un contenido relativamente alto de compuestos fenólicos totales (256 mg de EAG/ g de extracto) y lo correlacionaron con su potencial antioxidante DPPH (IC<sub>50</sub>: 0.58 mg/ml). Los autores también reportaron que el 97.4 % del total de compuestos identificados en el extracto de *Mentha spicata* representaban ácidos fenólicos, entre los que destacan el ácido quínico y salvianólico como compuestos principales. Sin embargo, hay estudios que reportan un efecto tóxico en hígado de forma dosis-dependiente (20 g/L) en infusiones de *M. spicata* administradas durante 30 días *ad libitum* en ratas Wistar (Akdogan et al., 2004).

#### 2.4.4. Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

*Hibiscus sabdariffa*, comúnmente conocida como “flor de jamaica” o “jamaica” en México, pertenece a la familia Malvaceae. Es una flor atractiva, que se distribuye en regiones tropicales y subtropicales (Figura 5). Actualmente China encabeza su producción, seguido de India, Sudán, Uganda, Indonesia, Malasia y en séptimo lugar México (Ariza-Flores et al., 2014; SAGARPA, 2016).



Figura 5. Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

El estado de mayor producción de *H. sabdariffa* en el país es Guerrero (con 75% de la producción, aproximadamente), seguido de Oaxaca, Michoacán, Nayarit y Puebla, principalmente. Tradicionalmente los cálices de *H. sabdariffa* son empleados para la producción de bebidas, mermeladas, jaleas, salsas, etcétera. Las variedades más cultivadas son la criolla, la China, Jerzy y Sudán (Ariza-Flores et al., 2014; Domínguez-Domínguez et al., 2007; SAGARPA, 2016).

Los componentes principales encontrados en los extractos de cálices de *H. sabdariffa* son ácidos orgánicos (ácido hidroxycítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hibiscus, ácido oxálico y ácido tartárico), antocianinas (delfinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido), flavonoides (hibiscitrina, quercetina y luteolina) y ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido protocatecuico, ácido elágico, ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido cafeico) que han sido reportados como los componentes principales del extracto acuoso de *H. sabdariffa*. Dichas moléculas han demostrado poseer actividades antiobesogénicas, antiinflamatorias, antioxidantes y algunos efectos sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares y control de DM (Ojulari et al., 2019; Riaz & Chopra, 2018; Villalpando-Arteaga et al., 2013). Sin embargo, la falta de un método estandarizado para analizar la composición fenólica de esta planta y las diferencias en los diseños de ensayo, sobre todo el empleo de dosis reales, así como los propios factores de la planta, dificultan establecer el compuesto fenólico responsable y la dosis recomendable para lograr resultados benéficos óptimos (Rodríguez-Pérez et al., 2019).

Estudios realizados por Alarcon-Aguilar et al. (2007) reportaron que la administración de 120 mg/kg/día de un extracto acuoso de *H. sabdariffa* a ratones obesos inducidos por glutamato monosódico durante un periodo de 60 días logró atenuar la ganancia de peso corporal y disminuir los niveles de glucosa en sangre. La mayoría de los estudios atribuyen la capacidad para evitar la ganancia de peso corporal a compuestos polifenólicos y flavonoides capaces de inhibir la acumulación de grasa (Alarcon-Aguilar et al., 2007). Por otro lado, Villalpando-Arteaga et al. (2013), reportaron que el extracto acuoso de *H. sabdariffa* atenuó el aumento de peso corporal en ratones obesos inducidos por dieta alta en grasa, después de tratarlos con 33 mg de antocianinas/kg de peso corporal tres veces a la semana durante 8 semanas. Los autores reportaron que el tratamiento con *H. sabdariffa* reguló SREBP-1 y PPAR- $\gamma$  y bloqueó el aumento de ARNm de IL-1, TNF- $\alpha$  y la peroxidación.

Además, diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* confirman el efecto hipoglucémico de *H. sabdariffa* y lo atribuyen a la inhibición en la actividad de  $\alpha$ -amilasa, impidiendo la absorción de azúcares y almidón, lo que está relacionado con una pérdida de peso (Alarcon-Aguilar et al., 2007).

Estudios han demostrado su efecto hipolipidémico al disminuir diferentes fracciones lipídicas en plasma, corazón, cerebro, riñón e hígado de ratas hipercolesterolémicas (El-Saadany et al., 1991). Se ha reportado que la administración de extractos de *H. sabdariffa* (500 y 1000 mg/kg) durante 6 semanas disminuyen los niveles de colesterol, triglicéridos y LDL en ratas hipercolesterolémicas (Hirunpanich et al., 2006). Además de mejorar la glucemia e incrementar los niveles de HDL-c en ratas diabéticas, efecto atribuido a los compuestos polifenólicos presentes en el extracto. Por una parte, se ha propuesto que la modulación de la absorción de grasa se debe a la excreción de ácido palmítico en heces (Carvajal-Zarrabal et al., 2009). Mientras que el efecto hipoglucémico es atribuido a la inhibición de la actividad de enzimas digestivas,  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, encargadas de la digestión y absorción de carbohidratos (Hansawasdi et al., 2000). Además, el efecto inhibitorio de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa es atribuido específicamente a la presencia de ácido gálico y ácido protocatecuico (Alegbe et al., 2019).

Con respecto a los posibles mecanismos de acción que expliquen el efecto hipoglucémico, Shadhan et al. (2019) evaluaron diferentes extractos de *H. sabdariffa* (metanólicos y las fracciones de acetato de etilo y butanol) sobre la absorción de glucosa en adipocitos 3T3F442A, así como la regulación del transportador de glucosa GLUT4 en L6 miotubos. Los autores reportan que dichos extractos no pudieron inducir la captación de glucosa y fueron incapaces de mejorar la distribución y regulación de GLUT4 en relación con el control. Por otro lado, la administración de la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *H. sabdariffa* aumentó la densidad numérica, volumen, área y diámetro de células del islote pancreático en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina.

Los autores concluyen que dicho extracto induce la regeneración de las células  $\beta$  pancreáticas, debido a su capacidad para eliminar radicales libres y reducir el estrés oxidativo (Adeyemi & Adewole, 2019). Por lo anterior, las propiedades de *H. sabdariffa* sobre el metabolismo de lípidos y el metabolismo de glucosa se han investigado ampliamente. Sin embargo, en México se consumen diferentes variedades de esta planta, conocida como “jamaica”, y la tonalidad roja es la que se ha estudiado en detalle (Alarcon-Aguilar et al., 2007). La variedad Sudan morada, un color oscuro, es muy consumida. Sin embargo, no existen reportes sobre los beneficios asociados a enfermedades metabólicas (Ariza-Flores et al., 2014). Por otro lado, se recomienda una dosis de 150-180 mg/kg/día ya que dosis más elevadas han reportado causar daño hepático (Akindahunsi & Olaleye, 2003). Así mismo, otros autores recomiendan dosis inferiores a los 1000 mg/kg debido a que demostraron que dosis mayores de 1000 mg/kg aumentan los niveles de urea, creatinina y ácido úrico, mientras que dosis mayores de 2000 mg/kg aumentan el daño hepático al elevar los niveles de AST, ALT y ALP en suero (Nwachukwu et al., 2015).

## **2.5. Análisis metabolómico: herramienta para detectar cambios en el perfil metabólico**

La metabolómica es una de las disciplinas centrales de la biología de sistemas, su objetivo es proporcionar nuevos conocimientos sobre la bioquímica de los organismos, mediante la caracterización de la presencia y las concentraciones de compuestos de bajo y medio peso molecular (<1.500 Dalton) a partir de muestras biológicas (tejidos o fluidos) que son producto de las reacciones metabólicas en los seres vivos. Los metabolitos endógenos (producidos dentro de un organismo) así como los metabolitos exógenos (los que se introducen del entorno, incluidos los componentes de los alimentos y las drogas) son objeto de estudio (Bain et al., 2009). Por tanto, la metabolómica resulta una herramienta útil debido a la identificación de cambios sutiles en los perfiles metabólicos (metaboloma) entre sistemas biológicos en diferentes estados fisiológicos o patológicos.

La ausencia o presencia de algunos metabolitos, así como su concentración relativa, puede ser un indicador de estados de enfermedad o factores de predisposición a ella. Otra de las aplicaciones de la metabolómica son los estudios toxicológicos, ya que el perfil de metabolitos en orina y otros fluidos corporales son indicativos de cambios fisiológicos causados por la exposición a un posible tóxico (McNiven et al., 2011).

Los enfoques dirigidos y no dirigidos son las dos estrategias principales en los análisis metabolómicos. El análisis dirigido se centra en metabolitos conocidos y existe una lista predeterminada o clase de metabolitos que se están investigando. Este enfoque es impulsado por hipótesis, donde se está abordando una pregunta específica. Una de las características clave de la metabolómica dirigida es el uso de patrones internos marcados con isótopos, lo que permite una identificación y cuantificación clara de los analitos. Por el contrario, la metabolómica no dirigida obtiene de manera imparcial toda la información de metabolitos (Chen et al., 2022; Sas et al., 2015).

### **2.5.1 Flujo de trabajo en el análisis metabolómico**

La metabolómica es una herramienta que explora la interacción de varios componentes, en este caso metabolitos, en un sistema biológico, proporcionando información cualitativa sobre el estado metabolómico del sistema. Separar, aislar y caracterizar los diferentes grupos de metabolitos es el primer paso en el flujo de trabajo de un análisis metabolómico. Entre las técnicas de separación más comunes se encuentra la cromatografía de líquidos (LC), la cual reduce la complejidad de la muestra biológica y permite una identificación fiable de metabolitos empleando espectrometría de masas (EM). LC es empleada para la detección de compuestos de moderadamente a altamente polares (ácidos grasos, fenoles, ácidos orgánicos, lípidos y otros compuestos) (Chen et al., 2022).



El segundo paso es el procesamiento de los datos obtenidos (reducción de ruido, corrección del tiempo de retención, detección e integración de picos y alineación) para el análisis de compuestos. El tercer paso es el procesamiento de datos en donde es necesario incluir muestras para control de calidad (QC) que permitan equilibrar el sesgo de la plataforma analítica y corregir el ruido en la señal. Posteriormente se realiza una normalización de los datos para reducir el sesgo sistemático y evitar una identificación errónea causada por el número dispar de una gran cantidad de datos metabolómicos. En ese sentido, el análisis multivariado de componentes principales (PCA) es empleado como un paso previo del análisis y control de calidad de los datos que permite visualizar si existen tendencias de clasificación entre los grupos experimentales. Mientras que el análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) es el más empleado para visualizar e identificar posibles biomarcadores (Chen et al., 2022).

### **2.5.2 Metabolómica y alteraciones metabólicas**

La metabolómica ha revelado que los aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina) están más fuertemente asociados con la resistencia a la insulina comparados con especies de lípidos comunes (Goetzman et al., 2018; Pallares-Méndez et al., 2016). Otros estudios también han identificado a los aminoácidos de cadena ramificada y algunos aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina) como predictores de DMT2, tanto en humanos como en modelos animales. Además, se ha identificado que los ácidos grasos saturados o monoinsaturados de menor cantidad de carbono se asocian con un mayor riesgo de DMT2, mientras que las cadenas de carbono más largas con el aumento del contenido de dobles enlaces (ácidos grasos poliinsaturados) que conlleva a un menor riesgo de DMT2 (Rhee et al., 2011; T. Wu et al., 2018).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus representa un grave problema de salud pública en México, responsable, tanto directa como indirectamente, del mayor número de muertes en nuestro país. La diabetes tipo 2 representa a más del 90% de los pacientes diagnosticados. Además, de acuerdo con la OMS, el 58% de los casos de diabetes son atribuibles al sobrepeso y la obesidad (WHO, 2019). Los tratamientos de la diabetes y la obesidad son un problema para los sistemas de salud, mismo que va en aumento, por lo que se necesitan tratamientos alternativos a los medicamentos que se utilizan. La medicina natural es una opción efectiva y de bajo costo, que queda de manifiesto por su alta incidencia en distintos estratos de la sociedad y su prevalencia a través de los años. El problema central de la medicina tradicional es la falta de estudios rigurosos que permitan identificar aquellas plantas que realmente son efectivas, la forma más adecuada de utilización y que no presenten efectos adversos a la salud, sobre todo por una administración prolongada. Dentro de las plantas utilizadas se encuentran: *Ibervillea sonorae*, *Justicia spicigera*, *Mentha spicata* o *Hibiscus sabdariffa*, las cuales se han reportado que tienen beneficios para el control de la diabetes. Sin embargo, algunas de estas se han evaluado en extractos no permitidos para consumo humano o en vías diferentes a la oral, que es la manera en que la población las consume. Además, es importante evaluar los posibles riesgos o efectos colaterales por consumo de estos preparados tradicionales.

## 4. HIPÓTESIS

Las decocciones de *Ibervillea sonorae*, *Justicia spicigera*, *Mentha spicata* y *Hibiscus sabdariffa*, debido a su contenido de compuestos bioactivos, tienen un efecto positivo para el control de la diabetes y las complicaciones asociadas, sin presentar efectos adversos a la salud.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto antidiabético de las decocciones herbales empleadas en la medicina tradicional y determinar su posible mecanismo de acción.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto antidiabético de las plantas propuestas mediante un estudio controlado y utilizando un modelo animal de diabetes.
- Determinar si alguna de las plantas tiene efectos fisiológicos adversos o tóxicos en el modelo propuesto.
- Postular el mecanismo de acción más probable para cada una de las plantas estudiadas mediante técnicas bioquímicas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material vegetal y preparación de las decocciones herbales

Se emplearon raíces de *Ibervillea sonorae* recolectadas en la localidad de Vicam en Sonora (27°25'6''N;109°50'6''W); tallos y hojas de *Justicia spicigera* obtenidos de Altamirano, Guerrero (18°21'0''N; 99°31'60''W) durante Julio de 2018. Un especialista autenticó las plantas y los números de registro (29539 y 29538, respectivamente) se depositaron en el Herbario USON de la Universidad de Sonora, México para futuras referencias. Las plantas de *Mentha spicata* empleadas en este estudio fueron adquiridas comercialmente (Floraplant S. A. de C. V., México), para la elaboración de las decocciones se emplearon los tallos y las hojas. La planta fue identificada en el Herbario "Dr. Jerzy Rzedowski" de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los cálices secos de *Hibiscus sabdariffa* de la variedad "Sudan Morada" fueron proporcionados por productores de la localidad de Palma larga, en el municipio de Santa María Tonameca (Oaxaca) con número de registro BGHI-013.

Las decocciones se prepararon de acuerdo con su uso tradicional y basado en las dosis reportadas en estudios anteriores para cada planta (Alarcon-Aguilar et al., 2002; Barajas-Ramírez et al., 2021; Fotakis et al., 2016; Ortiz-Andrade et al., 2012).

El material fresco de cada planta se secó a 40 °C durante 16 h en un horno de convección y luego se molió. Posteriormente el material seco de *I. sonorae* (10 g), *J. spicigera* (30 g), *M. spicata* (30 g) o *H. sabdariffa* (30 g) se hirvió en 1 L de agua durante 15 min. Las decocciones obtenidas se filtraron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente y luego se almacenaron a 4 °C. Todos los extractos se prepararon diariamente.

## **6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales de las decocciones herbales**

Con el fin de determinar la composición fitoquímica de cada una de las decocciones herbales y conocer sus posibles constituyentes biológicamente activos, se cuantificó el contenido polifenoles extraíbles como: compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y proantocianidinas extraíbles, como se detalla a continuación.

### **6.2.1. Compuestos fenólicos totales**

La cuantificación de fenoles totales de cada una de las decocciones estudiadas se realizó mediante el método de Folin-Coicalteu (Singleton et al., 1999) empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific). Brevemente, se tomaron alícuotas de cada decocción y se llevaron a un volumen final de 50  $\mu$ L en una microplaca. Posteriormente se adicionaron 25  $\mu$ L del reactivo de Folin-Coicalteu 1N y 125  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm. La cuantificación se realizó por interpolación empleando una curva estándar de ácido gálico y los resultados de fenoles totales se expresaron como equivalentes de ácido gálico por 100 g de planta seca (g AGE/100g).

### **6.2.2. Flavonoides totales**

Se cuantificó el contenido total de flavonoides de cada una de las decocciones estudiadas empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific) (Oomah et al., 2005). Brevemente, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L de cada decocción y se agregaron 180  $\mu$ L de agua destilada y 20  $\mu$ L de una solución metanólica de 2-aminoetil difeíl borato (10g/L). Posteriormente se midió la absorbancia a 404 nm. La cuantificación se realizó por interpolación empleando una curva estándar de rutina y los resultados se expresaron en mg de rutina equivalente por 100 g de planta seca (mg RE/100 g).

### 6.2.3. Antocianinas totales

Se utilizó el método de pH diferencial empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific), para la cuantificación de antocianinas totales (Giusti & Wrolstad, 2001). Brevemente, se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de cada decocción y se agregaron 175  $\mu\text{L}$  de cada solución amortiguadora (KCl 0.025M, pH 1 y  $\text{CH}_3\text{COONa}_3\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 M a pH 4.5). Finalmente, se midieron las absorbancias a 510 nm y 700 nm considerando ambos pH. Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de cianidin-3-O-glucósido por 100 g de planta seca (mg C-3-OG/100 g), empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales} = \frac{(A_{\text{total}})(\text{PM}_{\text{cianidin 3-O-glucósido}})}{(\epsilon_{\text{cianidin 3-O-glucósido}})(\text{Distancia})}$$

Dónde:

$$A_{\text{total}} = [(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4.5}}]$$

$$\text{PM}_{\text{cianidin 3-O-glucósido}} = 448.8 \text{ g/mol}$$

$$\epsilon_{\text{cianidin 3-O-glucósido}} = 26900 \text{ M cm}^{-1}$$

$$\text{Distancia} = 1 \text{ cm}$$

### 6.2.4. Proantocianidinas totales

Se determinó el contenido de proantocianidinas empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific) (Zielinski et al., 2019). Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada decocción y se adicionaron 1200  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de vainillina al 4%. La solución se agitó y se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado. La solución se agitó nuevamente y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente se midieron las absorbancias a 500 nm. La cuantificación se realizó por interpolación empleando una curva estándar de quercetina y los resultados se expresaron en mg de quercetina equivalentes por 100 g de planta seca (mg QE/100 g).

### **6.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos extraíbles mediante UPLC-PDA-ESI-QqQ en las decocciones herbales**

La identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides se realizó mediante UPLC-PDA-ESI-QqQ (Díaz-Rivas et al., 2018). La separación de compuestos se llevó a cabo utilizando un sistema cromatográfico de líquidos de ultra rendimiento (UPLC) acoplado con una matriz de fotodiodos en tándem (PDA), ionización por electro pulverización (ESI) y a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Xevo TQS, Waters Corp., Wexford).

Las decocciones herbales individuales fueron preparadas y posteriormente cada una se filtró (econofilter PVDF 13mm 0.45 $\mu$ m) y se inyectó 1  $\mu$ L en el sistema UPLC. Brevemente, los compuestos fenólicos se separaron en una columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) operada a 35 °C, empleando un caudal de 0.4 mL/min. Las fases móviles consistieron en una solución de agua con 0.1 % de ácido fórmico (Fase A) y acetonitrilo (Fase B). La elución en gradiente se realizó como se indica en el Cuadro 1, con un tiempo total de corrida de 16 min. El rango de longitud de onda se estableció entre 250 y 560 nm. Se usó un cosolvente (metanol con 0.1% de ácido fórmico (v/v), 5  $\mu$ L/min), para múltiples reacciones de ionización para espectrometría de masas en tándem (MS/MS) usando unas condiciones de solventes isocráticos (Waters Corp., Milford). Las condiciones para la identificación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides en modo negativo ESI fueron: voltaje capilar 2.5 kV, flujo de gas de desolvatación 800 L/h, flujo de gas de cono 150 L/h, flujo de gas de colisión 0.13 ml/min, energía de colisión en modo MS 5.0 eV y energía de colisión en modo MS/MS 20.0 eV.

Se emplearon estándares (20 ng/ $\mu$ L) para identificar el tiempo de retención y los valores m/z y las transiciones MS/MS. El modo de seguimiento de reacciones múltiples se registró para muestras y estándares.



Cuadro 1. Gradiente empleado en el método cromatográfico para la determinación de compuestos fenólicos extraíbles

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	97	3
1.23	91	9
3.82	84	16
11.4	50	50
13.34	97	3
15	97	3

## 6.4. Evaluaciones *in vitro*

### 6.4.1. Capacidad de inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa de las decocciones herbales

Se determinó la capacidad de inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa *in vitro* (Apostolidis et al., 2007). Brevemente, se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución de almidón (1 %, p/v en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6.9 con NaCl 6 mM) y se incubaron a 25 °C por 10 min. Después de la incubación se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución de  $\alpha$ -amilasa (0.5 mg/mL) y se incubó a 25 °C por 10 min. La reacción se detuvo con 200  $\mu$ L de ácido dinitrosalicílico (DNS) y la mezcla se llevó a baño maría por 5 min. Posteriormente se transfirieron 50  $\mu$ L de la mezcla y se adicionaron 200  $\mu$ L de agua. La absorbancia se midió a 540 nm, empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición } \alpha\text{-amilasa} = \left[ \frac{(A_{540}^{\text{Control}} - A_{540}^{\text{Muestra}})}{(A_{540}^{\text{Control}})} \right] * 100$$

#### **6.4.2. Capacidad de inhibición de la enzima lipasa pancreática de las decocciones herbales**

Se determinó la capacidad de inhibición de la lipasa (McDougall et al., 2009). Brevemente la lipasa pancreática bovina tipo II (L3126, Sigma) se disolvió en agua MiliQ (10 mg/mL) y posteriormente se centrifugó a 3000 g por 5 min. Se empleó Tris 100 mM (pH 8.2) y una solución de 0.08 % (p/v) p-nitrofenil laurato disuelto en acetato de sodio 5 mM (pH 5) con 1 % de tritón X-100 como sustrato. Para el ensayo se mezclaron 400 µL del amortiguador, 150 µL de la solución de lipasa, 50 µL de la muestra y 450 µL de la solución de sustrato para comenzar la reacción. Las muestras se incubaron a 37 °C por 2 h y posteriormente se centrifugaron a 30 000 g durante 3 min y se analizaron a 400 nm, empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific). El porcentaje de inhibición se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición lipasa pancreática} = [(A_{400}^{\text{Control}} - A_{400}^{\text{Muestra}}) / (A_{400}^{\text{Control}})] * 100$$

#### **6.5. Material biológico**

Se adquirieron 80 ratas Wistar macho de 6 semanas de edad (200-250 g) del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB, UNAM, Juriquilla, Querétaro, México). Las ratas se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar (temperatura de 24±2 °C; humedad del 40-60 % y ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h) con acceso libre a agua y alimento comercial (Rodent Lab Chow 5001, Purina Nutriments) durante 1 semana para su aclimatación.

Todos los procedimientos en animales se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Federales para la Experimentación y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO-1999 México, SAGARPA) y fueron aprobados por el Comité de Bioética (CBQ18 / 011) de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ, Querétaro, México).

## 6.6. Evaluación del efecto de las decocciones herbales en un modelo *in vivo*

Se determinó el efecto benéfico de las decocciones herbales en un modelo de obesidad inducido por dieta y el posible efecto adverso en ratas alimentadas con una dieta comercial. Primero, las ratas se dividieron al azar en dos grupos (40 ratas cada uno). El grupo control tuvo acceso libre a una dieta comercial estándar (DC) y el grupo obeso tuvo acceso libre a una dieta alta en grasa y fructosa (DAG), es decir, dieta comercial suplementada con 18 % de fructosa grado alimenticio y 20 % de manteca de cerdo comercial (carnicería local) durante 12 semanas. La composición de ambas dietas se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de las dietas empleadas en el modelo *in vivo*

	DC	DAG
Proteínas	23.9 %	14.8 %
Lípidos	5 % (1.6 % grasa saturada)	23.1 % (8.8 % grasa saturada)
Carbohidratos	48.7 % (0.3 % fructosa)	58.2 % (18.2 % fructosa)

### 6.6.1. Grupos de experimentación

Después de 12 semanas, los animales se subdividieron aleatoriamente en cinco grupos (8 ratas cada uno), como se indica en el Cuadro 3. Las decocciones herbales (*Ibervillea sonorae*, *Justicia spicigera*, *Mentha spicata* o *Hibiscus sabdariffa*) se administraron *ad libitum* a los grupos tratados, mientras que se proporcionó agua *ad libitum* a los grupos control (control y obeso), durante 12 semanas. El peso corporal y la ingesta de alimento y bebida se monitoreó semanalmente. La dosis total consumida de cada planta se determinó según el consumo de bebida y se calculó la conversión a dosis humana (Reagan-Shaw et al., 2008).

Cuadro 3. Grupos de experimentación

Grupos	Tratamiento	Dieta
Control	Agua	Comercial
I	<i>Ibervillea sonora</i>	Comercial
II	<i>Justicia spicigera</i>	Comercial
III	<i>Mentha spicata</i>	Comercial
IV	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Comercial
Obeso	Agua	Alta en grasa y fructosa
I	<i>Ibervillea sonora</i>	Alta en grasa y fructosa
II	<i>Justicia spicigera</i>	Alta en grasa y fructosa
III	<i>Mentha spicata</i>	Alta en grasa y fructosa
IV	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Alta en grasa y fructosa

### 6.6.2. Prueba de tolerancia oral a la glucosa

A la semana 12, los animales se mantuvieron en ayuno durante toda la noche antes del ensayo. Una solución de glucosa se administró a una dosis de 4 mL/kg (50 %, p/v) por vía oral empleando sonda y la glucosa en sangre se midió de la vena de la cola empleando tiras reactivas con ayuda de un glucómetro Accu-Chek® Active. Después de la administración de glucosa, se midieron los niveles de glucosa circulante a los 30, 60, 120 y 180 min. Después de 12 semanas del tratamiento con las diferentes decocciones herbales, se repitió el procedimiento y se midieron los niveles de glucosa en sangre a 0, 60 y 120 min. Se emplearon cinco animales por grupo.

### 6.6.3. Sacrificio

Después de 24 semanas, las ratas fueron decapitadas y se recolectaron muestras de sangre, hígado, tejido adiposo, colon y riñones. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 g durante 10 min para obtener suero, el cual se almacenó a -80 °C hasta su análisis bioquímico. Se registró el peso absoluto de los órganos individuales, todos los tejidos se lavaron con solución fisiológica (0.9 % NaCl).

Una porción de cada tejido se almacenó en formalina tamponada neutra al 10 % (pH 7.4) para el análisis histopatológico, mientras que una fracción de hígado, tejido adiposo y riñón se congelaron inmediatamente para análisis bioquímicos.

## **6.7. Evaluación de los efectos de las decocciones herbales en ratas obesas inducidas con una dieta hipercalórica**

### **6.7.1. Cuantificación del perfil lipídico en suero**

Se determinó cuantitativamente el perfil lipídico en suero utilizando kits de química clínica de la marca Spinreact empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific), como se menciona a continuación: determinación directa de HDLc-D y LDLc-D mediante un ensayo enzimático colorimétrico (Ref. 1001096 y 41023, respectivamente), triglicéridos-LQ empleando un ensayo enzimático colorimétrico por glicerol fosfato oxidasa y peroxidasa (GPO-POD) (Ref. 41030) y colesterol-LQ por ensayo enzimático del colesterol oxidasa y peroxidasa (CHOD-POD) (Ref. 41020).

### **6.7.2. Cuantificación de glucosa, insulina en suero y cálculo del índice HOMA-IR**

Se cuantificó el nivel de glucosa en suero empleando un kit enzimático colorimétrico (Spinreact) por glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD) (Ref. 41010) y se cuantificó insulina en suero mediante un kit de ELISA (EZRMI-13K, Merck Millipore®) empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific). Para la cuantificación de los valores de insulina se empleó el software ELISA Analysis (<https://www.elisaanalysis.com/app>). Finalmente, para cuantificar el nivel de resistencia a insulina, el índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assesment for Insulin Resistance) se calculó de la siguiente forma:

$$HOMA-IR = [\text{Insulina en ayuno } (\mu Uml^{-1}) * \text{glucosa en ayuno } (mmolL^{-1})] / 22.5$$

### **6.7.3. Análisis histopatológico en hígado y tejido adiposo**

Se tomaron al azar secciones de tejido hepático y tejido adiposo visceral para su procesamiento histopatológico. Las secciones de cada tejido se lavaron con solución fisiológica (0.9 % NaCl) y posteriormente se embebieron en formalina tamponada neutra al 10 % (pH 7.4) y se almacenaron a temperatura ambiente.

Para el análisis histopatológico las muestras se seccionaron en fragmentos de 4  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) (Culling, 1974). El contenido de grasa hepática se calculó tomando la relación del área media de las zonas compuestas por gotas lipídicas de 9 campos por animal y el área total evaluada.

Se determinaron los niveles de hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (Ríos et al., 2018). Brevemente, se determinó el tamaño de los adipocitos (hipertrofia) calculando el área media de 9 campos por animal y se calculó el número relativo de adipocitos (hiperplasia) dividiendo del área media de las zonas compuestas por gotas lipídicas por el área media de los adipocitos. Las mediciones se realizaron empleando un microscopio óptico (Leica, DM500) con ayuda del software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

### **6.7.4. Cuantificación de triglicéridos en hígado**

La extracción de triglicéridos en hígado se realizó siguiendo el método establecido para tejidos (Folch et al., 1957). Brevemente, se pesaron 150 mg de tejido hepático congelado y se homogenizó con 350  $\mu\text{l}$  de una solución de KOH (30% p/v): etanol (1:2 v/v). Las muestras se incubaron toda la noche a 55 °C. Posteriormente, la mezcla se llevó a un volumen de 1000  $\mu\text{L}$  con etanol: agua (1:1, v/v) y se centrifugó a 12 000 g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se llevó a un volumen final de 1200  $\mu\text{L}$ . Una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  se mezcló con 215  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  1M, la mezcla se incubó en hielo por 10 min.

Finalmente se centrifugó a 12 000 g por 5 min y los triglicéridos fueron cuantificados con un kit enzimático comercial (Spinreact, Ref. 41030) empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como mg de triglicéridos por gramo de tejido hepático.

#### **6.7.5. Cuantificación de triglicéridos en heces**

Las muestras de heces se recolectaron durante 24 h en jaulas individuales y se secaron a 55°C durante 24 h. Posteriormente las heces secas se molieron en un mortero. Las muestras secas (150-200 mg) se incubaron con una solución de KOH (30% p/v): etanol (1:2 v/v) por 24 h a 60°C. Después de la incubación, el contenido de triglicéridos en heces se determinó como se describe en la sección 6.7.4.

### **6.8. Evaluación de los efectos adversos por el consumo de las decocciones herbales en ratas alimentadas con dieta estándar**

#### **6.8.1. Análisis histopatológico y mediciones histomorfométricas en hígado, riñones y colon**

Se tomaron al azar secciones de tejido hepático, adiposo, renal y muestras de colon descendente al recto para su procesamiento histopatológico como se describe en la sección 6.7.3. Los cambios histomorfométricos se evaluaron únicamente en ratas alimentadas con dieta comercial. El área glomerular y el espacio de Bowman se adquirieron de 9 glomérulos de diferentes áreas del riñón. La profundidad de la cripta y la túnica mucosa se midieron en 9 secciones del colon. Además, se contaron las células del globo dentro de un área de 100 µm en cinco criptas de 9 campos. Se emplearon ocho animales por grupo.

### 6.8.2. Cuantificación de parámetros relacionados con daño hepático

Se cuantificaron, en suero, enzimas relacionadas con daño celular, como lactato deshidrogenasa (LDH), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) utilizando kits comerciales de la marca Spinreact (Ref. 41220, 41282 y 41270, respectivamente). También se determinaron cuantitativamente los parámetros relacionados con colestasis hepática como: fosfatasa alcalina (ALP),  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT), bilirrubina total (TBIL) y bilirrubina directa (DBIL) utilizando kits comerciales (Ref. 41240, 41290 y 1001044, respectivamente) empleando un espectrofotómetro (Multiskan GO 1510-05200, Thermo Scientific).

Por otra parte, la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de membrana es considerada un importante mecanismo de toxicidad. Se determinó la peroxidación lipídica en tejido hepático siguiendo el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Wright et al., 1981). Primero, se preparó un homogenizado empleando 200 mg de tejido hepático y 1000  $\mu$ L de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 con KCl 1.17%. Posteriormente, 2500  $\mu$ L del homogenizado se mezclaron con 300  $\mu$ L HCl 5N, 625  $\mu$ L de TCA al 40% y 625  $\mu$ L de TBA al 2%. Las mezclas se incubaron en hielo por 5 min y se centrifugaron a 30000 g por 5 min. La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 532 nm. Los resultados se expresaron como moles equivalentes de TBARS. Finalmente, se realizó una extracción de proteínas empleando 400 mg de tejido hepático y 1000  $\mu$ L de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.1 mM PMS) para determinar la oxidación de proteínas empleando el método de carbonilo (Lenz et al., 1990). Brevemente, a 300  $\mu$ L del extracto de proteínas obtenido anteriormente se le adicionaron 100  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 y 200  $\mu$ L de una solución de DNPH. La reacción se agitó e incubó a 37 °C por 1 h. Posteriormente se agregaron 325  $\mu$ L de una solución de TCA al 50 % fría y se incubó a 4 °C por 10 min. Después se centrifugó a 5000 g por 10 min, el sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó 4 veces con una solución de etanol-acetato de etilo (1:1), en cada lavado se centrifugó a 13000 g por 4 min.



Posteriormente el precipitado se disolvió empleando 1000  $\mu$ L de una solución de guanidina 6M y se incubó a 37 °C por 15 min. Finalmente se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C y se midió la absorbancia a 375 nm usando guanidina como blanco. Los resultados se expresaron como restos de carbonilo por  $\mu$ g de proteína.

### **6.8.3. Cuantificación de parámetros relacionados con daño renal**

El daño renal fue valorado cuantificando las concentraciones de ácido úrico, urea y creatinina en suero y orina empleando kits comerciales (Spinreact, Ref. 41000, 41042 y 1001111, respectivamente). Se determinaron los niveles de proteína en orina empleando el método colorimétrico (Lowry et al., 1951). La cuantificación se realizó por interpolación empleando una curva estándar de albúmina.

Finalmente, se determinó la peroxidación lipídica en tejido renal siguiendo el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Wright et al. (1981) y oxidación de proteínas en riñón empleando el método de carbonilo descrito por Lenz et al. (1990), ambas metodologías descritas en la sección 6.8.2.

## **6.9. Determinación de la expresión relativa de genes por RT-qPCR**

### **6.9.1. Extracción de RNA y síntesis de ADNc**

El ARN total se extrajo de tejido hepático y tejido adiposo con 1000  $\mu$ L de Trizol (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se valoraron utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific), mientras que la integridad del ARN se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADNc de la primera cadena se sintetizó con 1  $\mu$ g de ARN total utilizando M-MLV Transcriptase inversa (Promega) en un termociclador (T100TM, BIO-RAD).

### 6.9.2 Análisis RT-qPCR

La expresión génica de cada muestra se analizó por duplicado en un sistema StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, California, EE. UU.) Utilizando LightCycler Sybr Green I máster (Roche). El ADNc se amplificó usando cebadores para glucosa-6-fosfatasa (*g6p*), fosfoenolpiruvato carboxil quinasa (*pck1*) en tejido hepático, receptor de insulina (*insr*) y transportador de glucosa regulado por insulina tipo 4 (*glut4*) en tejido adiposo. Las características de cada cebador se encuentran en el Cuadro 4. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando cinco animales por grupo y la expresión génica se realizó por duplicado para cada individuo. La abundancia relativa de ARN se calculó mediante normalización a los mejores genes de endógenos (*ppia*, *sod*, *actb*) sugeridos por NormFinder. Para determinar los niveles relativos de expresión génica, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## 6.10. Análisis metabolómico en tejido hepático por UPLC/QTOF-MS

### 6.10.1. Preparación del extracto hepático

Se homogenizaron en hielo aproximadamente 100 mg de tejido hepático con 1500  $\mu$ L de una solución fría de metanol:agua (1:1) y posteriormente se centrifugaron las muestras homogenizadas a 14500 *g* durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se secó en un sistema SpeedVac Concentrator (SC210A, Thermo Scientific Savant) a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C hasta el día del análisis. Cada muestra se reconstituyó en 250  $\mu$ L de acetonitrilo:agua (3:1) y se mezclaron con ayuda de un vortex por 2 min (Liu et al., 2020). Finalmente, las muestras fueron filtradas empleando econofilter PVDF 13mm 0.45 $\mu$ m y colocadas en viales ámbar con septos de PTFE/silicona (Agilent, Santa Clara, CA) para su análisis por UPLC-MS. Las muestras del control de calidad (QC) se generaron agrupando un volumen idéntico de todas las muestras de estudio (el sobrenadante obtenido posterior a resuspender cada muestra en el disolvente apropiado).

Cuadro 4. Características de los oligos de genes endógenos y genes problemas empleados

Gen	Número de acceso NCBI	5´-secuencia-3´ (sentido/antisentido)	Tamaño estimado del amplificado (pb)
<i>ppia</i> (Peptidilprolil isomerasa A)	NM_017101.1	AGCACTGGGGAGAAAGGATT / AGCCACTCAGTCTTGGCAGT	247
<i>sod</i> (Superóxido dismutasa)	NM_017051.2	TGGACAAACCTGAGGCCTAA / GACCCAAAGTCACGCTTGATA	75
<i>actb</i> (Beta-actina)	NM_031144.3	CCATCATGAAGTGTGACGTTG / ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	175
<i>g6p</i> (Glucosa-6-fosfatasa)	L37333.1	ATAAAACAGTTCCCCGTCACC / GCCCAGTATCCCAACCACA	179
<i>pck1</i> (Fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa)	NM_198780.3	CCCTGCCAGCCAATGTCC / ATGACCTTGCCCTTATGCTCT	201
<i>irs1</i> (Sustrato receptor de insulina)	NM_012969.1	CCCCAAACGCTCGATCC / CTCCAGCCCCGTCATGGT	200
<i>glut4</i> (Transportador de glucosa tipo 4)	NM_012751.1	GGCTCCCTTCAGTTTGGCTA / GCCCTTTTCCTTCCCAACCA	233

### 6.10.2. Método cromatográfico

La separación cromatográfica de los extractos de hígado se llevó a cabo empleando una columna UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m, Waters Corp., Milford, MA, USA) con un sistema ACQUITY UPLC I CLASS. La temperatura de la columna y del auto muestreador se mantuvieron a 35 °C y a 5 °C, respectivamente. La velocidad del flujo fue de 0.4 mL/min y se inyectó una alícuota de 1.5  $\mu$ L de cada muestra (Liu et al., 2020).

Un blanco de muestra y dos QC se inyectaron cada 8 muestras para evaluar la estabilidad del instrumento, mientras que las muestras se inyectaron de forma aleatoria. La fase móvil consistió en una solución de agua con 0.1% ácido fórmico (Fase A) y acetonitrilo (Fase B). Los metabolitos se eluyeron mediante un gradiente como se muestra en el Cuadro 5 (Liu et al., 2020).

Cuadro 5. Gradiente empleado en el método cromatográfico para el análisis metabolómico

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	98	2
1.5	80	20
6	30	70
10	2	98
12	2	98
14	30	70
16	98	2
19	98	2

### 6.10.3. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas de cuadrupolo de tiempo de vuelo, Vion IMS QTOF-MS (Waters), equipado con una fuente de ionización por electro pulverización (ESI). Se adquirieron los datos de LC-MS en modo de barrido completo centroide (m/z 50-1200) (Liu et al., 2020).

Los parámetros analíticos fueron los siguientes: la tasa de gas de desolvatación de nitrógeno se estableció en 900 L/h, la tasa de gas de cono de nitrógeno se estableció en 100 L/h, la temperatura de desolvatación fue de 500 °C en modo de ionización positiva y 550 °C en modo de ionización negativa, la temperatura de la fuente de 100 °C, el voltaje capilar se fijó en 1.8 kV en modo positivo y en 1.5 kV en modo negativo. El voltaje de cono se fijó en 70 V en positivo y en 10 V en modo negativo, el tiempo de exploración fue de 0.4 s y el intervalo de exploración interno de 0.1 s. Para una adquisición de masa precisa, se usó una masa de bloqueo de leucina-encefalina para monitorear los modos de los iones positivos  $[M+H]^+=556.2771$  y negativos  $[M+H]^-=554.2615$  al bloquear la interfaz de rociado en un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Liu et al., 2020).

#### **6.10.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico**

Los formatos de datos obtenidos del equipo UPLC/MS se procesaron empleando el software UNIFI (Waters), en donde se realizó la corrección de masas. Posteriormente los datos fueron exportados al software Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Waters) para su procesamiento y análisis.

Primero se llevó a cabo la etapa denominada alineación, la cual permite comparar con precisión los compuestos al corregir cualquier desviación en los tiempos de retención usando un QC como referencia. Posteriormente se seleccionó el diseño entre sujetos, lo que permitió agrupar las muestras de acuerdo con las condiciones experimentales. Se seleccionaron parámetros como aductos esperados y los rangos de tiempo de retención a evaluar para encontrar los compuestos presentes en la muestra en el proceso conocido como *peak picking*. Posteriormente, los iones fueron agrupados por compuesto en un proceso llamado deconvolución. En este paso, se eliminaron señales que no cumplían con las características de ionización o no se consideraban picos cromatográficos. Finalmente, se realizó un análisis estadístico como se describe en la sección 6.11 para distinguir las diferencias entre los grupos.

## 6.11. Análisis estadístico

Los resultados de las evaluaciones fisiológicas se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). La comparación de medias de cada tratamiento se llevó a cabo por el método de Tukey-Kramer empleando un nivel de confianza del 95% para establecer diferencias estadísticas. Los datos se analizaron con el paquete estadístico JMP 10.

Para comparar el perfil de metabolitos en hígado y asociarlos al efecto del consumo de las decocciones herbales se realizó un análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA) en donde se incluyeron las muestras y los QC, para evaluar la calidad y revelar las diferencias o similitudes entre las muestras. Posteriormente se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), con el fin de distinguir las diferencias entre los grupos y mejorar la validez y la capacidad analítica. Los datos se analizaron empleando la plataforma MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Análisis de compuestos fenólicos totales e identificación y cuantificación de compuestos empleando UPLC-PDA-ESI-QqQ de cada decocción herbal

Los efectos benéficos reportados en las decocciones herbales están relacionados con su composición fitoquímica y se han atribuido principalmente a su contenido de compuestos fenólicos. Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides, antocianinas y las proantocianidinas han mostrado tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo de carbohidratos y la homeostasis de glucosa, además de mejorar el aumento de peso corporal y disminuir o inhibir la actividad de las enzimas relacionadas con el daño hepático (Bacanli et al., 2019). Por lo tanto, estos compuestos fueron cuantificados. Además, se sabe que las decocciones son mezclas complejas en las que pueden estar presentes diferentes tipos de compuestos, por lo que también se realizó un análisis por UPLC-PDA-ESI-QqQ que reveló la presencia de 21 ácidos fenólicos y 19 flavonoides. El perfil de cada una de las decocciones herbales se muestra en el Cuadro 6. La decocción de *M. spicata* mostró la mayor cantidad de flavonoides totales y compuestos fenólicos totales, el ácido rosmarínico y la naringina se encontraron en mayor proporción. La decocción de *H. sabdariffa*, mostró un mayor contenido de antocianinas y proantocianidinas totales, en donde el ácido 4-O-cafeoilquínico y la quercetina fueron los componentes más abundantes. Finalmente, para las decocciones de *I. sonorae* y *J. spicigera*, el ácido salicílico y la miricetina fueron los compuestos fenólicos más abundantes.

Los compuestos presentes en decocciones de *I. sonorae* son poco conocidos. En trabajos anteriores, el efecto hipoglucémico de los extractos de diclorometano de esta planta se ha atribuido a los monoglicéridos y al contenido de ácidos grasos (Hernández-Galicia et al., 2007). Sin embargo, debido a la naturaleza lipídica de estos compuestos, no pueden estar presentes en una preparación tradicional ya que es principalmente acuosa.

Por otro lado, una mejora en la absorción *in vitro* de glucosa por las células adiposas se ha atribuido a la alta concentración de ácido gálico presente en extractos acuosos (Zapata-Bustos et al., 2014). En nuestro estudio, el ácido gálico se encuentra presente en la decocción de *I. sonorae*, sin embargo, el ácido salicílico y el ácido 4-O-cafeoilquínico fueron los compuestos más abundantes. Los resultados podrían ser diferentes debido a las condiciones de cultivo (ubicación geográfica, prácticas agrícolas) así como la edad. Por otra parte, los efectos antihiperoglucémicos del ácido salicílico se han reportado previamente a través de la activación directa de AMPK (Hawley et al., 2012). Además, los derivados del ácido cafeoilquínico (CQA) también han demostrado tener efectos benéficos a la salud al mejorar la sensibilidad a la insulina mediante la estimulación de la captación de glucosa a través de la activación de la vía AMPK-AS160-GLUT4 e inhibiendo la gluconeogénesis hepática (Wu et al., 2014).

Por otro lado, se ha informado que la kaempferitina fue el principal metabolito secundario presente en el extracto etanólico de *J. spicigera* (Ortiz-Andrade et al., 2012; Sepúlveda-Jiménez et al., 2009). Sin embargo, no hay informes sobre los compuestos fenólicos encontrados en extractos acuosos de *J. spicigera*.

Los principales compuestos bioactivos encontrados en extractos de *M. spicata*, han sido reportados previamente y concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Los ácidos fenólicos más representativos en *M. spicata* son los ácidos rosmarínico, gálico, clorogénico y cafeico, mientras que entre los flavonoides más destacados se encuentra la catequina y la quercetina (Fotakis et al., 2016). Estudios han reportado que las catequinas, presentes en productos derivados del té, la canela o la cocoa, pueden inhibir la actividad de la lipasa pancreática y  $\alpha$ -amilasa (Rodríguez-Pérez et al., 2019), efectos reportados anteriormente para los extractos de *M. spicata*. Así mismo, la presencia de ácido gálico y ácido protocatecuico en *H. sabdariffa* se ha relacionado con el efecto inhibitorio de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa encontrado en esta planta (Alegbe et al., 2019).



Cuadro 6. Compuestos fenólicos en las decocciones herbales

<b>Compuestos</b>	<b><i>I. sonorae</i></b>	<b><i>J. spicigera</i></b>	<b><i>M. spicata</i></b>	<b><i>H. sabdariffa</i></b>
Compuestos fenólicos totales <sup>1</sup>	350.0±10.0	1230.0±200.0	16230.0±2480.0	12830.0±450.0
<b>Ácidos fenólicos</b>				
Ácido benzoico	0.773±0.170	0.291±0.056	0.258±0.188	0.353±0.066
Ácido 4-hidroxibenzoico	0.327±0.012	0.291±0.080	0.087±0.019	0.247±0.055
Ácido tras-cinámico	0.173±0.070	0.109±0.017	0.093±0.033	0.036±0.025
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	0.053±0.012	0.016±0.010	0.107±0.068	0.631±0.089
Ácido 2,4,6 trihidroxibenzaldehido	0.070±0.014	0.027±0.007	0.018±0.004	0.044±0.010
Ácido protocatecuico	0.100±0.035	0.144±0.080	0.153±0.101	1.660±0.277
Ácido cumárico	0.733±0.234	0.220±0.085	0.044±0.023	0.260±0.134
Ácido vanillico	0.340±0.072	0.313±0.107	0.078±0.027	0.349±0.143
Ácido gálico	0.027±0.031	0.013±0.000	0.016± 0.014	5.802±1.256
Ácido shikimico	1.747±1.300	2.833±0.225	3.020±1.753	6.847±0.000
Ácido cafeico	1.513±0.528	0.431±0.062	0.753±0.297	1.013±0.702
Ácido quínico	0.107±0.064	0.100±0.024	31.11±13.79	5.229±1.443
Ácido ferúlico	0.187±0.070	0.153±0.064	0.116±0.062	1.029±0.625
Ácido siríngico	0.373±0.012	4.064±1.509	0.182±0.077	13.529±5.385
Ácido caftárico	0.420±0.361	0.900±0.447	1.407±0.675	0.171±0.159
Ácido 4-O-Cafeoilquínico	3.547±1.378	3.304±1.332	37.15±16.73	1397.96±465.7
Ácido clorogénico	0.153±0.012	0.129±0.068	0.240±0.085	47.131±13.244

Ácido rosmarínico	0.047±0.042	0.071±0.060	58.518±11.019	0.140±0.104
Ácido 3,4/4,5-dicafeoilquinico	0.160±0.125	0.140±0.101	0.593±0.450	4.700±2.263
Ácido salicílico	5.213±0.850	6.120±1.466	8.478±3.723	29.380±12.350
Ácido elágico	0.200±0.160	0.102±0.038	0.067±0.070	0.164±0.113
<b>Flavonoides totales<sup>2</sup></b>	<b>109.0±160.0</b>	<b>4200.0±330.0</b>	<b>7890.0±1000.0</b>	<b>2910.0±100.0</b>
Flavonoides				
Apigenina	ND	ND	0.031±0.023	ND
Naringenina	ND	ND	0.073±0.059	0.011±0.010
Acacetina	0.020±0.000	0.020±0.007	0.002±0.004	ND
Luteolina	0.010±0.014	0.004±0.008	0.251±0.0163	0.091±0.057
Kaempferol	ND	0.007±0.000	0.007±0.000	0.264±0.183
Eriodictiol	ND	ND	0.116±0.025	0.009±0.004
Epicatequina	0.020±0.000	ND	ND	0.007±0.000
Quercetina	0.160±0.226	0.176±0.071	0.047±0.007	8.298±2.009
Miricetina	0.847±1.123	1.583±1.070	0.351±0.340	11.569±8.857
Mangiferina	0.020±0.000	0.004±0.004	0.009±0.004	0.002±0.004
Epigallocatequina galato	0.010±0.014	ND	ND	ND
Kaempferol 3-O-glucosido	ND	0.010±0.005	ND	2.636±0.787
Galocatequin galato	ND	ND	ND	0.003±0.005
Phlorizina	ND	ND	ND	0.020±0.000
Quercetina glucuronido	ND	0.013±0.000	0.298±0.193	0.007±0.000
B2 Procianidina	ND	0.007±0.000	ND	ND

Naringina	ND	0.023±0.014	12.737±9.461	0.007±0.000
Rutina	0.540±0.283	0.800±0.476	1.878±1.051	9.731±1.943
Neohesperidina	ND	0.033±0.052	6.113±8.646	0.058±0.10
<b>Antocianinas totales<sup>3</sup></b>	1.3±0.4	5.4±0.1	3.7±0.5	356.2±1.4
<b>Proantocianidinas totales<sup>4</sup></b>	8940.0±100.0	5710.0±70.0	2890.0±140.0	16370.0±260.0

<sup>1</sup>Miligramos de ácido gálico equivalente por 100 g de planta seca.

<sup>2</sup>Miligramos de rutina equivalente por 100 g de planta seca

<sup>3</sup>Miligramos de cianidin-3-O-glucosido equivalente por 100 g de planta seca.

<sup>4</sup>Miligramos de quercetina equivalente por 100 g de planta seca.

Los resultados están expresados como miligramos por 100 g de planta seca y los valores representan el promedio de tres determinaciones independientes ± desviación estándar. ND: Abajo del límite de detección.

Nuestros resultados indican que estas decocciones contienen compuestos bioactivos que podrían ayudar al control de la diabetes. En general, se ha reportado que los mecanismos de acción mediante los cuales los compuestos polifenólicos regulan la diabetes incluyen una mejora en el metabolismo de glucosa, mejora de la integridad y fisiología de las células  $\beta$  pancreáticas, regulación de la sensibilidad y resistencia a la insulina, activación del transportador GLUT4 y el receptor de insulina en músculo y reducción de la absorción de glucosa en el medio intestinal (Ojulari et al., 2019).

## **7.2. Efecto de las decocciones herbales sobre el control de obesidad inducido por dieta en un modelo *in vivo*.**

En la medicina tradicional mexicana, plantas como *I. sonorae*, *J. spicigera*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* se utilizan ampliamente, principalmente de forma empírica, para prevenir o tratar enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes. Existen varios estudios que evalúan las propiedades terapéuticas de dichas plantas, pero existe poca información de sus extractos acuosos o decocciones, así mismo, no se analiza el efecto del consumo crónico de éstas (Alarcon-Aguilar et al., 2005; Ortiz-Andrade et al., 2012). En consecuencia, se decidió utilizar preparaciones tradicionales (decocciones acuosas), debido a que es la forma más común de consumirlo.

### **7.2.1. Efecto de las decocciones herbales sobre el peso corporal y el consumo de alimento**

Las ratas obesas alimentadas con una dieta hipercalórica aumentaron significativamente su peso corporal (27.2%) en la semana 12 y continuó hasta el final del experimento (32.6%), en la semana 24, comparado con el grupo control, alimentado con una dieta comercial (Figura 6). Se ha reportado que el consumo de dietas hipercalóricas ricas en fructosa aumenta el consumo de energía total, peso corporal, riesgo de obesidad, enfermedad de hígado graso, perfil lipídico aterogénico y resistencia a la insulina (Rivera-Ramírez et al., 2011).

Por lo tanto, una reducción del peso corporal es de relevancia fisiológica, debido a una mejora de estas alteraciones metabólicas.

Al final del estudio, después de 12 semanas de tratamiento con las diferentes decocciones herbales, únicamente el tratamiento con la decocción de *H. sabdariffa* presentó un menor aumento de peso corporal en un 10.6% comparado con el grupo obeso (Figura 6). Por el contrario, el consumo de las decocciones de *I. sonorae*, *J. spicigera* o *M. spicata* no tuvieron ningún efecto en el control de peso corporal en animales alimentados con DAGF.

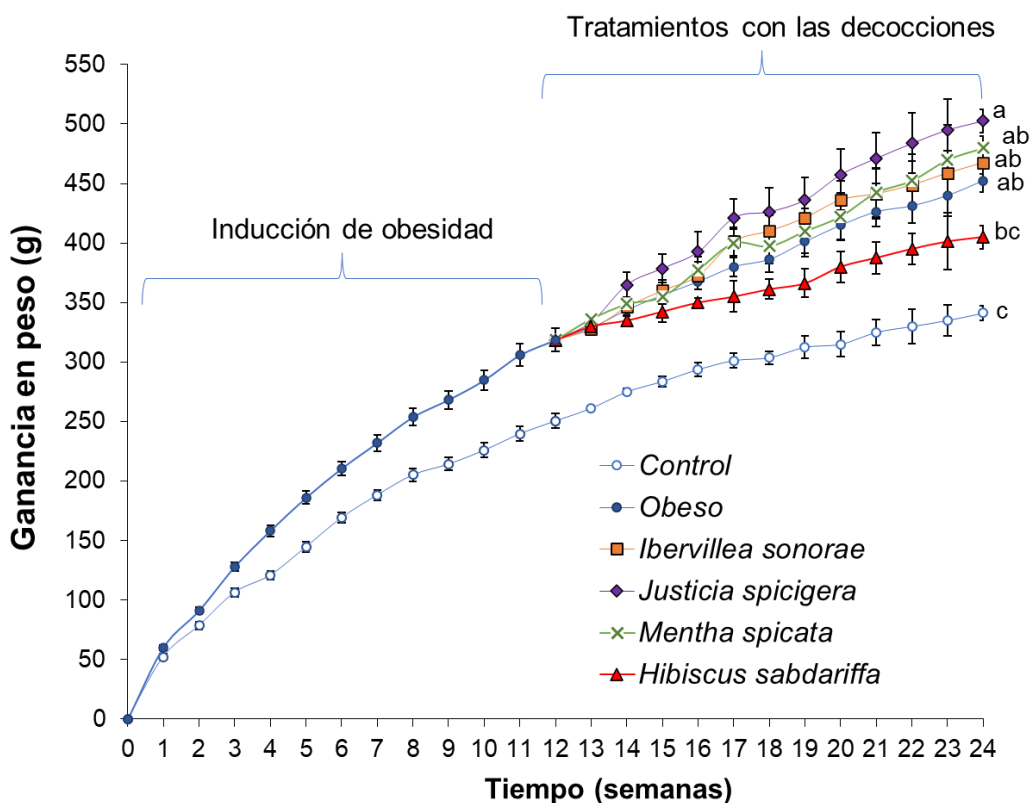


Figura 6. Ganancia en peso corporal del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Rivera-Ramírez et al. (2011), reportaron que la administración de diferentes concentraciones de *I. sonorae* (100, 200 y 400 mg/kg) durante 8 semanas disminuyó la ganancia de peso corporal y el consumo de alimento y calorías en ratones alimentados con una DAGF.

La diferencia de los resultados reportados por estos autores y los encontrados en nuestro estudio podría atribuirse a que los autores administraron la decocción de *I. sonorae* de forma preventiva, es decir, esta fue proporcionada a animales sanos que iniciaban con el consumo de una dieta alta en grasa y fructosa. Mientras que, en nuestro estudio, la decocción se administró a animales obesos, como tratamiento y los animales presentaban algunas complicaciones como intolerancia a la glucosa, lo que podría disminuir la capacidad de la decocción. Asimismo, también podría influir la maduración, lugar y tiempo de cosecha de la planta empleada.

En el caso de las decocciones de *M. spicata*, autores reportaron un posible efecto antiobesogénico relacionado a la capacidad de estas de inhibir la lipasa pancreática *in vitro*, la cual favorece la digestión de triglicéridos (Jamous et al., 2018). Sin embargo, en nuestro estudio la administración *in vivo* de *M. spicata* no tuvo efecto sobre el control de peso corporal. Una posible explicación podría estar relacionada a que los compuestos capaces de inhibir a la lipasa podrían modificarse durante el proceso de digestión.

Respecto a la administración de decocciones de *J. spicigera*, los animales tratados no mostraron un efecto sobre el control de peso corporal en animales alimentados con una dieta hipercalórica. Sin embargo, no hay estudios que reporten el efecto de la administración de esta planta sobre el peso corporal.

Finalmente, la administración de *H. sabdariffa*, presentó un menor aumento de peso corporal en un 10.6% comparado con el grupo obeso. Se ha reportado que una disminución del 5-10% en el peso corporal es considerada beneficiosa para la salud (Alarcon-Aguilar et al., 2007). Por lo que, en nuestro estudio, el consumo de la decocción de *H. sabdariffa* tiene un efecto favorable en el control de peso corporal. Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Villalpando-Arteaga et al. (2013), quienes administraron un extracto acuoso de *H. sabdariffa* durante 8 semanas a ratones obesos inducidos por dieta, observando una reducción en el aumento de peso, atribuyendo dicho efecto a una disminución en la lipogénesis, diferenciación de adipocitos y un aumento en la  $\beta$ -oxidación.

Estudios *in vivo* e *in vitro*, han reportado que el extracto de *H. sabdariffa* inhibe la actividad de  $\alpha$ -amilasa, impidiendo la absorción de carbohidratos, disminuyendo así la ganancia de peso (Aларcon-Aguilar et al., 2007). La mayoría de los estudios atribuyen la capacidad para disminuir la ganancia de peso corporal a compuestos polifenólicos encontrados en esta planta, los cuales inhiben la acumulación de grasa (Aларcon-Aguilar et al., 2007; Villalpando-Arteaga et al., 2013).

Por otro lado, el consumo de alimento fue monitoreado cada semana y los resultados se muestran en la Figura 7A. Se observa que el consumo de alimento fue mayor en los animales alimentados con una dieta estándar (grupo control), comparando con aquellos que recibieron una dieta alta en grasa y fructosa. Este efecto se debe a que la DAGF proporciona más energía (5.258 Kcal) comparada con una dieta estándar (4.109 Kcal). El consumo de energía fue similar para todos los grupos (Figura 7B).

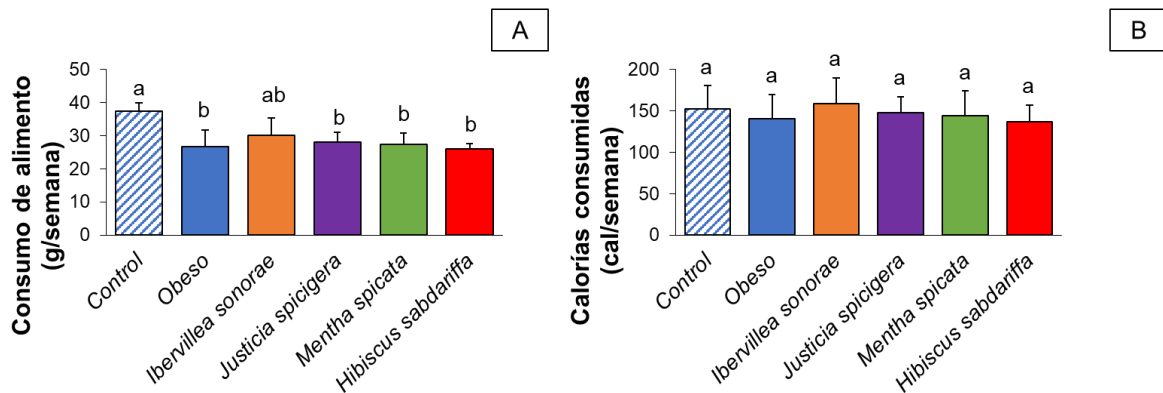


Figura 7. Consumo de alimento (A) y energía (B) del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados indican que el efecto de control de peso encontrado con el consumo de *H. sabdariffa* no está relacionado con la supresión del apetito, debido a que no se observaron cambios en la ingesta de alimento o energía. Por otra parte, Rivera-Ramírez et al. (2011) reportaron una disminución de la ingesta de alimento y calorías con el consumo de *I. sonorae*. Sin embargo, en nuestro estudio, no se observaron diferencias con respecto al consumo de alimento o energía entre los diferentes grupos.

Esto podría atribuirse a la forma de administración de la decocción, es decir, como un tratamiento correctivo parece no tener un efecto en el peso corporal y el consumo de alimento.

### **7.2.2. Almacenamiento de lípidos y morfología del tejido adiposo visceral**

Las dietas altas en grasa producen una acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo, que es un factor importante para el desarrollo de enfermedades metabólicas (Rivera-Ramírez et al., 2011). Además, una dieta alta en grasa, junto con la inactividad física conduce a un incremento excesivo de triglicéridos en los adipocitos lo que induce hipertrofia (aumento en el tamaño de adipocitos) (Longo et al., 2019). En la Figura 8A se muestran las micrografías del tejido adiposo visceral de los grupos de estudio, en donde se puede apreciar un cambio evidente en la morfología de los adipocitos del grupo obeso con respecto al grupo control, en el que se muestran adipocitos con mayor volumen.

La hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos del tejido adiposo visceral se calculó empleando el software Imagen J y los resultados se muestran en la Figura 8B y 8C. El grupo control obeso aumentó significativamente la hipertrofia (131.7 %) y la hiperplasia (91.2%) de los adipocitos comparado con el grupo control. Se ha reportado que cuando el tamaño de las células adiposas alcanza un umbral crítico debido a la sobrecarga de lípidos, se aumentan las citocinas proinflamatorias que promueven defectos en la translocación de GLUT4 a la membrana y, por lo tanto, se generan alteraciones en la señalización de insulina (Chait & den Hartigh, 2020; Longo et al., 2019). Por otra parte, un aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) es considerado como un mecanismo de recuperación, en el que el tejido adiposo intenta reparar las alteraciones metabólicas anteriormente descritas (Chait & den Hartigh, 2020).

Estos resultados indican que el grupo obeso presenta una alteración en la remodelación del tejido adiposo visceral, provocada por el consumo de una dieta hipercalórica, lo que podría producir alteraciones que inducen al desarrollo de resistencia a insulina como se verá más adelante.



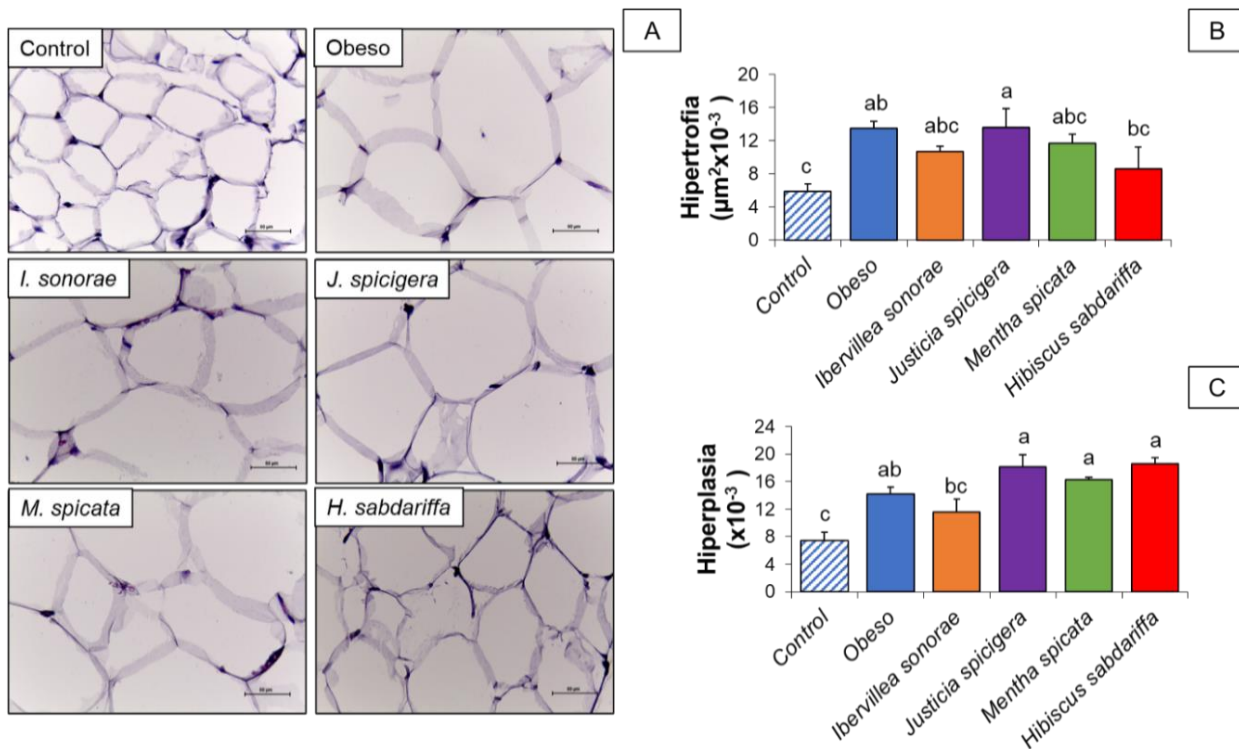


Figura 8. Micrografías representativas de secciones de tejido adiposo visceral (X40). (A) Efecto de las decocciones herbales sobre la B) hipertrofia e C) hiperplasia en adipocitos del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Al final del estudio, se puede apreciar que únicamente las ratas obesas que consumieron la decocción de *H. sabdariffa* mostraron un cambio observable en la morfología del tejido adiposo (Figura 8A), mostrando adipocitos más pequeños. Además, el consumo de esta decocción logró disminuir la hipertrofia en un 36.2% (Figura 8B). Este efecto sugiere un menor almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos, lo que podría estar relacionado con una modulación en la absorción de grasa. Se ha reportado que los extractos de *H. sabdariffa* modulan la absorción de grasa al aumentar la eliminación de ácido palmítico en heces (Sellami et al., 2017; Villalpando-Arteaga et al., 2013).

Dicho mecanismo podría estar relacionado con la inhibición de la lipasa pancreática, impidiendo que los triglicéridos sean degradados y absorbidos.

### 7.2.3. Almacenamiento de grasa en el tejido hepático

En la obesidad, una sobrecarga calórica conduce a una acumulación de grasa en tejidos ectópicos como el hígado, fenómeno que conduce a alteraciones metabólicas como resistencia a insulina (Després, 2012; Longo et al., 2019). Además, dicha acumulación está relacionada con la obesidad (80-90%), la DMT2 (30-50%) y la hiperlipidemia (>90%) (Prasomthong et al., 2022). Por lo tanto, evaluar la morfología y la acumulación anormal de lípidos en el tejido hepático es importante debido al papel que desempeña el hígado en el mantenimiento de la homeostasis y equilibrio energético. En la Figura 9A se observa que los animales alimentados con una dieta hipercalórica mostraron una excesiva acumulación de vacuolas lipídicas (flechas negras) dentro de los hepatocitos comparados con el grupo control. Además, el grupo obeso aumentó significativamente el contenido de triglicéridos en hígado en un 238.2% (Figura 9B).

Estos resultados demuestran que el consumo crónico de una dieta hipercalórica conduce a la acumulación anormal de lípidos en hígado. En ese sentido, se estima que entre el 15 y 20 % del contenido de triglicéridos presentes en el hígado provienen de la dieta, de tal forma que el hígado es altamente susceptible a la acumulación de lípidos ectópicos (Chait & den Hartigh, 2020; Longo et al., 2019). En este sentido, las decocciones de *I. sonora*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* disminuyeron el contenido de triglicéridos en hígado (10.4, 11.5 y 21.5 %, respectivamente). Sin embargo, no produjeron ningún cambio en la acumulación de vacuolas lipídicas (Figura 9A). Anteriormente se reportó que *H. sabdariffa* previno la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasa y fructosa mediante la inhibición de la lipogénesis de *novo* (Prasomthong et al., 2022).

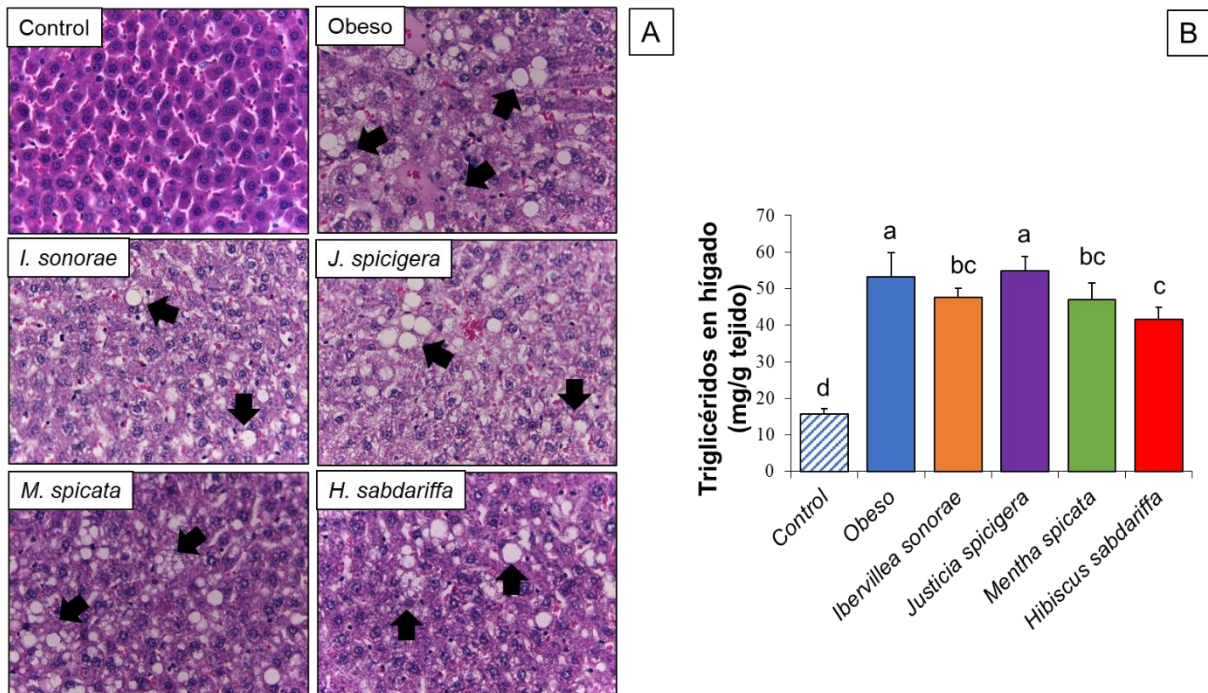


Figura 9. A) Micrografías representativas de secciones de tejido hepático (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre el B) contenido de triglicéridos en hígado de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

#### 7.2.4. Perfil de lípidos en suero

La excesiva acumulación de grasa en el tejido adiposo trae como consecuencia una disfunción de los adipocitos, promoviendo la liberación de ácidos grasos debido a un aumento en la lipólisis basal y al desarrollo de resistencia a insulina. La lipólisis y el aumento de ácidos grasos conducen al desarrollo de dislipidemia, caracterizada por un aumento de colesterol y triglicéridos, así como una disminución en los niveles de HDL (Després, 2012). En nuestro estudio, no se observaron cambios en los niveles de colesterol total o HDL-c en los grupos de estudio. Sin embargo, el grupo obeso mostró los niveles más elevados de triglicéridos en suero en un 61.9% con respecto al grupo control (Cuadro 7).

Cuadro 7. Niveles séricos de triglicéridos, colesterol total y HDL-c de los animales de estudio.

Grupos	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol total (mg/mL)	HDL-c (mg/mL)
Control	91.9±2.3 <sup>c</sup>	80.1±8.8 <sup>a</sup>	35.1±4.6 <sup>a</sup>
Obeso	148.8±11.2 <sup>a</sup>	82.5±6.4 <sup>a</sup>	26.8±2.6 <sup>b</sup>
<i>Ibervillea sonora</i>	112.3±5.6 <sup>bc</sup>	85.4±11.9 <sup>a</sup>	31.0±6.4 <sup>ab</sup>
<i>Justicia spicigera</i>	119.5±10.4 <sup>ab</sup>	82.9±7.0 <sup>a</sup>	29.2±3.4 <sup>ab</sup>
<i>Mentha spicata</i>	150.0±6.5 <sup>a</sup>	82.9±6.8 <sup>a</sup>	29.2±5.3 <sup>ab</sup>
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	88.9±4.0 <sup>c</sup>	79.2±5.1 <sup>a</sup>	25.8±3.5 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que el grupo obeso presenta un tejido adiposo disfuncional, lo que promueve una mayor lipólisis y por tanto una mayor circulación de ácidos grasos libres al hígado, lo que promueve el desarrollo de hipertrigliceridemia y acumulación de lípidos ectópicos.

Los tratamientos con las decocciones de *I. sonora* o *H. sabdariffa* redujeron significativamente los niveles de triglicéridos en suero en un 24% y 40.2%, respectivamente. Los triglicéridos de la alimentación son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol por las lipasas. Además, se ha demostrado que estas enzimas aumentan su actividad en ratas alimentadas con dietas altas en grasa promoviendo el aumento de peso corporal, desarrollo de dislipidemias, resistencia a insulina y esteatosis hepática (Prasomthong et al., 2022). En ese sentido, la disminución en los niveles de triglicéridos en suero por el consumo de estas decocciones podría estar relacionado con una disminución en la absorción de ácidos grasos (Jamous et al., 2018) y, por lo tanto, explicar el control de peso observado con el tratamiento de *H. sabdariffa*. Anteriormente, se informó que los cálices de *H. sabdariffa* disminuían los niveles de triglicéridos en suero al aumentar la excreción de grasas en las heces (Amaya-Cruz et al., 2019). Estudios han reportado la capacidad de compuestos como los polifenoles, saponinas y terpenos presentes en plantas para inhibir enzimas digestivas como la lipasa pancreática responsable de la hidrólisis de las grasas, por lo que su inhibición tiene efectos favorables en la prevención de la obesidad (Sellami et al., 2017).

### 7.2.5. Capacidad de inhibición de la lipasa pancreática de las decocciones herbales

Aproximadamente de un 90 a un 95 % de la grasa que proviene de la dieta se ingiere como triglicéridos, estos se hidrolizan produciendo monoglicéridos y ácidos grasos libres, los cuales son absorbidos por los enterocitos para sintetizar nuevas moléculas de triglicéridos, que se transportan a diferentes órganos. La lipasa pancreática es una enzima responsable de la hidrólisis del 50 al 70 % del total de las grasas de la dieta, por lo que su inhibición tiene efectos favorables en la prevención de la obesidad (Sellami et al., 2017). Varios estudios han reportado la capacidad de compuestos polifenólicos proveniente de las plantas para inhibir enzimas digestivas como la lipasa pancreática (Amaya-Cruz et al., 2019). En la Figura 10A se muestra la capacidad de las decocciones de *I. sonoreae*, *J. spicigera*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* para inhibir *in vitro* a la lipasa pancreática.

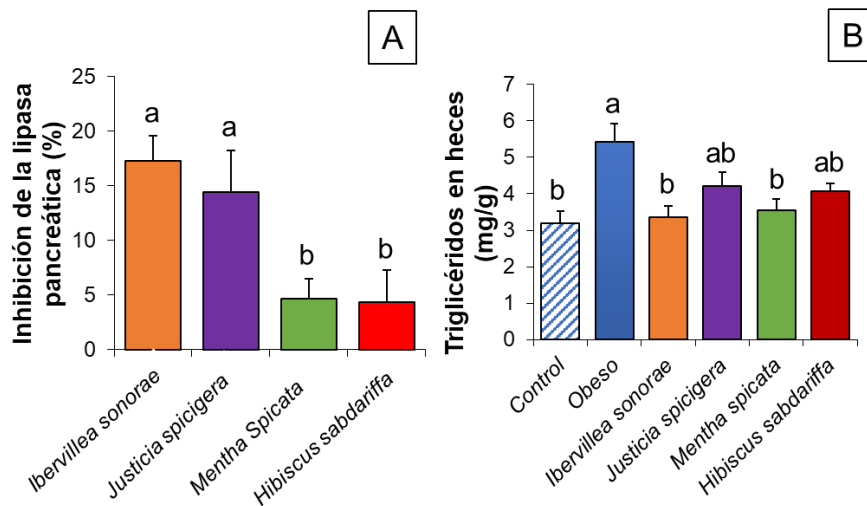


Figura 10. Efecto de las decocciones herbales sobre la inhibición de la lipasa pancreática (A) y sobre el contenido de triglicéridos en heces (B). Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Las decocciones de *I. sonorae* (17%) y *J. spicigera* (10%) mostraron una moderada inhibición de la lipasa pancreática, mientras que las decocciones de *M. spicata* o *H. sabdariffa* mostraron una ligera inhibición de dicha enzima. Por otro lado, un aumento en la excreción de triglicéridos en heces es un indicativo de una disminución en su absorción y por tanto una inhibición de la lipasa pancreática (Sellami et al., 2017). En nuestro estudio, el grupo obeso incrementó el contenido de triglicéridos en heces comparado con el grupo control. Estos resultados se deben al consumo crónico de una dieta hipercalórica. Por otro lado, el tratamiento con las decocciones no mostró un incremento en el contenido de triglicéridos en heces (Figura 10B). Aunque el tratamiento con *H. sabdariffa* mostró los efectos más favorables en la disminución de triglicéridos en suero y control de peso corporal, estos resultados demuestran que estos efectos son independientes de este mecanismo.

#### **7.2.6. Inhibición *in vitro* de la $\alpha$ -amilasa**

Uno de los blancos terapéuticos empleados para el control de la diabetes es la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa, responsable de la hidrólisis del almidón proveniente de la dieta, de forma que la glucosa pueda ser absorbida en el torrente sanguíneo. Cuando dicha enzima es inhibida, la absorción de glucosa disminuye lo que se traduce en un efecto hipoglucémico (Semotiuk et al., 2020).

En la Figura 11 se observa el efecto de las decocciones de *I. sonorae*, *J. spicigera*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* sobre la inhibición *in vitro* de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Las decocciones de *I. sonorae* o *H. sabdariffa* mostraron los efectos más favorables sobre la inhibición de  $\alpha$ -amilasa, 52 y 78%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo previamente descrito por Semotiuk et al. (2020), en donde reportaron que un extracto de *I. sonorae* actúa como un inhibidor competitivo de la actividad de  $\alpha$ -amilasa de forma dosis-dependiente ( $IC_{50}=3.0$  mg/mL). Para *H. sabdariffa*, el potencial efecto hipoglucémico de esta planta ha sido previamente atribuido a la inhibición de la actividad de enzimas digestivas, como  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (Adisakwattana et al., 2012; Hansawasdi et al., 2000).

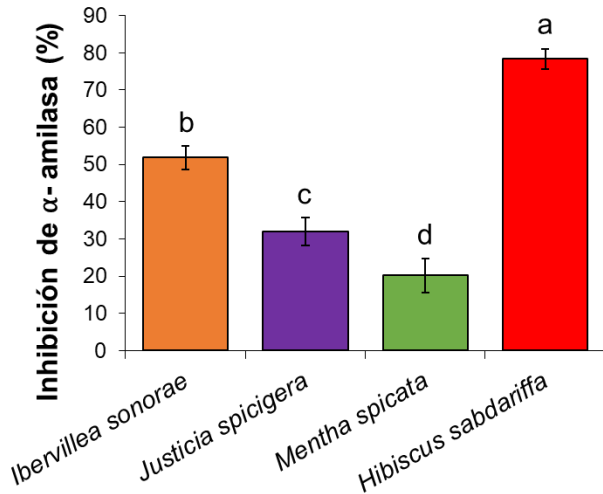


Figura 11. Capacidad de inhibición in vitro de la enzima  $\alpha$ -amilasa por las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

El efecto inhibitorio de dichas enzimas es atribuido concretamente a la presencia de ácido gálico y ácido protocatecuico presentes en los extractos de *H. sabdariffa* (Alegbe et al., 2019). En nuestro estudio, estos compuestos fueron detectados en las decocciones; sin embargo, es difícil atribuir dicho efecto a un solo compuesto ya que este tipo de preparaciones pueden contener numerosos metabolitos vegetales.

Nuestros resultados indican que las decocciones de *I. sonorae* o *H. sabdariffa* podrían ayudar a controlar la glucosa en sangre después de comidas altas en almidón.

### 7.2.7. Efecto sobre la homeostasis de glucosa

La medición de glucosa plasmática posterior a la carga (GPP) durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa puede predecir el riesgo de desarrollar DMT2 y las complicaciones asociadas (Bergman et al., 2018). Durante esta prueba, la producción hepática de glucosa se suprime, de tal forma que la medición de la GPP reflejará la captación y utilización de glucosa por los tejidos periféricos. En la Figura 12 se muestra la GPP de los grupos control, mientras que en la Figura 13 se muestra la GPP después del tratamiento con las decocciones herbales.

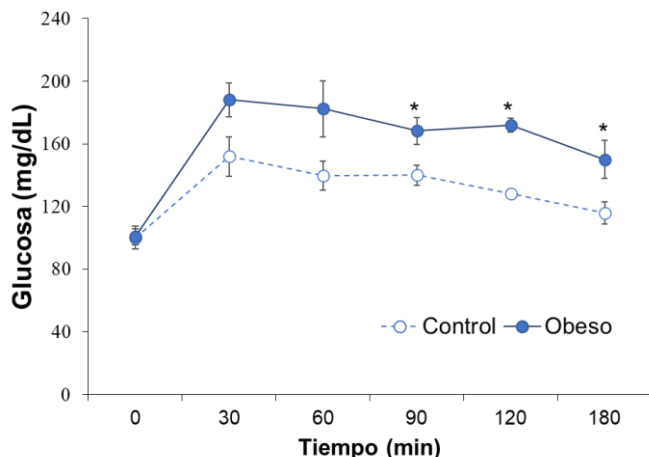


Figura 12. Curva de tolerancia oral a la glucosa de los grupos control, alimentado con dieta estándar y el grupo obeso, alimentado con dieta alta en grasa y fructosa. \*Indica diferencia estadística contra el grupo control, empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

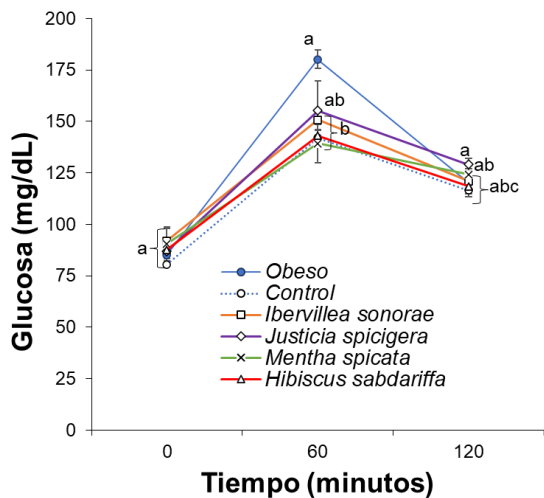


Figura 13. Prueba de tolerancia a la glucosa de grupos control y grupos tratados con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

A las 12 semanas (antes del tratamiento con las decocciones herbales) se realizó la curva de tolerancia. El grupo control obeso aumentó significativamente los niveles de GPP en un 34% (120 min) a las 12 semanas (Figura 12). Al final del experimento, las ratas obesas aumentaron la GPP en un 26.9% (60 min) en comparación con el grupo control (Figura 13).



El grupo obeso ejerció el mayor valor de GPP a 1 h ( $178.7 \pm 10.5$  mg/dL) después de la ingesta oral de glucosa. Se ha sugerido que  $1h\text{-PPG} > 155$  mg/dL identifica a individuos con mayor riesgo de desarrollar DM2 (Bergman et al., 2018). Lo que indica que la dieta hipercalórica produjo una intolerancia a la glucosa en los grupos que consumieron este tipo de dieta antes de los tratamientos con las decocciones. El consumo de las cuatro decocciones herbales redujo la GPP a los 60 min en un rango de 13.9 a 22.7 % (Figura 13).

Este es el primer informe del efecto hipoglucemiante de *I. sonorae* o *M. spicata* durante una prueba de tolerancia a la glucosa. Por otro lado, el extracto etanólico de *J. spicigera* ha reportado reducir el nivel de glucosa en sangre a 1 h después de una ingesta oral de glucosa en ratas diabéticas. Además, en el mismo estudio, el extracto etanólico de *J. spicigera* estimuló la absorción *in vitro* de glucosa en células adiposas sensibles a la insulina y resistentes a la insulina (Ortiz-Andrade et al., 2012). Previamente, se informó una mejora de la tolerancia a la glucosa para los extractos etanólicos de *H. sabdariffa* en ratas diabéticas, atribuyendo este efecto a un aumento en la secreción de insulina (Pannangpetch et al., 2013). En nuestro estudio, estas decocciones mostraron regular la tolerancia a la glucosa en un modelo de obesidad, por lo que los compuestos bioactivos de esta planta podrían tener varios mecanismos de acción, independientemente del tipo de extracto.

Por otra parte, un nivel de glucosa elevado durante un estado de ayuno sugiere una alteración en la glucogenólisis y gluconeogénesis. La cuantificación de los niveles de glucosa e insulina en suero, así como el cálculo del índice HOMA-IR se muestran en el Cuadro 8. Los niveles de glucosa e insulina en suero aumentaron significativamente en las ratas obesas (18.7% y 150%, respectivamente) comparado con el grupo control.

Estos resultados sugieren que el grupo obeso presenta una respuesta disminuida en los tejidos periféricos a la acción de insulina, provocando un aumento compensatorio de esta hormona para mantener la homeostasis de glucosa.

Cuadro 8. Niveles séricos de glucosa, insulina y cálculo del índice HOMA-IR

Grupos	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)	Índice HOMA-IR
Control	96.5±2.0 <sup>ab</sup>	2.4±1.0 <sup>d</sup>	12.4±5.5 <sup>c</sup>
Obeso	114.6±3.3 <sup>a</sup>	6.0±0.9 <sup>a</sup>	37.2±5.2 <sup>a</sup>
<i>Ibervillea sonora</i>	105.3±8.8 <sup>ab</sup>	4.7±1.4 <sup>abcd</sup>	27.2±8.4 <sup>ab</sup>
<i>Justicia spicigera</i>	110.7±7.6 <sup>ab</sup>	5.7±0.2 <sup>ab</sup>	34.4±2.6 <sup>a</sup>
<i>Mentha spicata</i>	113.4±7.3 <sup>a</sup>	5.1±1.1 <sup>abc</sup>	31.3±5.3 <sup>a</sup>
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	100.5±6.5 <sup>ab</sup>	3.2±1.0 <sup>cd</sup>	17.5±6.1 <sup>bc</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

El cálculo del índice HOMA-IR permite, mediante una fórmula validada, definir un valor numérico de resistencia a insulina. En consecuencia, las ratas obesas presentaron los valores más altos de índice HOMA-IR y una intolerancia a la glucosa. Se ha reportado que las dietas hipercalóricas pueden afectar el metabolismo de la glucosa, lo que resulta en hiperinsulinemia, función pancreática alterada de la secreción de insulina e intolerancia a la glucosa (Rivera-Ramírez et al., 2011). En nuestro estudio, las decocciones de *J. spicigera* o *M. spicata* no mostraron un efecto benéfico sobre los niveles de insulina e índice HOMA-IR en ratas obesas. Las propiedades hipoglucémicas de *M. spicata* se reportaron previamente en ratas diabéticas (Farid et al., 2018). En nuestro estudio, las ratas obesas mostraron una resistencia a la insulina, mientras que la diabetes es una enfermedad establecida, con diferentes blancos alterados, lo que podría explicar estas diferencias. Por otro lado, *J. spicigera* se consume comúnmente antes de cada comida (Ortiz-Andrade et al., 2012). En nuestro estudio, las ratas obesas consumieron el equivalente diario de 500 mL de la decocción acuosa de *J. spicigera* para una persona de 60 kg y no se observaron efectos benéficos sobre los niveles de insulina e índice HOMA-IR. Previamente, los extractos etanólicos de *J. spicigera* han reportado tener un efecto hipoglucémico (Ortiz-Andrade et al., 2012). Se sabe que el solvente utilizado para las extracciones modifica al perfil y contenido de compuestos fenólicos. Por lo tanto, la decocción podría estar afectando la extracción de compuestos bioactivos presentes en esta planta capaces de generar el efecto favorable descrito por los autores.

Alarcon-Aguilar et al. (2002) reportaron que la presencia de células  $\beta$  pancreáticas funcionales es necesaria para el efecto hipoglucémico de *I. sonorae* debido a una mejora en la secreción de insulina. Sin embargo, en nuestro estudio, *I. sonorae* no restaura ni aumenta los niveles de insulina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y fructosa. Por otra parte, Zapata-Bustos et al. (2014) demostraron que *I. sonorae* estimula la captación de glucosa *in vitro* activando la vía de señalización de la insulina. Por lo tanto, una mejora de la captación de glucosa mediada por insulina por los tejidos periféricos podría ser el mecanismo de acción hipoglucémico de *I. sonorae*.

En general, nuestros resultados mostraron que el consumo de *I. sonorae* mejoró los niveles de triglicéridos y glucosa en ratas obesas. Los compuestos fitoquímicos de *I. sonorae* son poco conocidos. En nuestro estudio se cuantificaron 21 ácidos fenólicos y 8 flavonoides en la decocción de *I. sonorae*, en donde los ácidos salicílico y 4-O-cafeoilquínico fueron los compuestos más abundantes (Cuadro 6). Los efectos antihiperoglucémicos y antihiperlipidémicos del ácido salicílico se han reportado previamente a través de la activación directa de AMPK (Hawley et al., 2012; Zhang et al., 2013). La decocción de *I. sonorae* se consume por la población mexicana, aproximadamente en unos 75 mg/kg/día (Alarcon-Aguilar et al., 2005). Las ratas obesas consumieron aproximadamente 404.6 mg/kg de esta planta, lo que equivale a 400 mL diarios de decocción de *I. sonorae* para una persona de 60 kg, por lo que el consumo habitual de esta decocción podría tener efectos benéficos sobre los niveles de glucosa y triglicéridos.

El tratamiento con la decocción de *H. sabdariffa* mejoró significativamente la sensibilidad a la insulina al disminuir los niveles de glucosa e insulina y, por tanto, mejorar los niveles del índice HOMA-IR. En la obesidad, los adipocitos hipertróficos aumentan la secreción de adipocinas proinflamatorias, alterando la señalización de la insulina. Además, se ha informado que la pérdida de peso sostenida y la disminución del tamaño de los adipocitos podrían mejorar la homeostasis de la glucosa sistémica al reducir la disfunción de los adipocitos (Longo et al., 2019).

Con base a los resultados descritos anteriormente, los efectos benéficos encontrados en este estudio para el tratamiento con la decocción de *H. sabdariffa* podrían explicarse por una mejora en el control de peso corporal, así como una reducción en la disfunción de los adipocitos y una mayor sensibilidad a la respuesta de insulina. Los efectos de *H. sabdariffa* se han asociado ampliamente con la presencia de ácidos orgánicos y polifenoles extraíbles (Morales-Luna et al., 2019). Los compuestos derivados del ácido cafeoilquínico (CQA), como los ácidos 4-O-cafeoilquínico y clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico), fueron los compuestos principales observados en la decocción de *H. sabdariffa* (Cuadro 6). Previamente, se ha informado que los CQA mejoran la sensibilidad a la insulina estimulando la captación de glucosa a través de la activación de la vía AMPK-AS160-GLUT4 e inhibiendo la gluconeogénesis hepática (Wu et al., 2014). Además, se ha demostrado que la presencia de quercetina, otro compuesto encontrado en la decocción de esta planta mejora la sensibilidad a la insulina, incrementando la captación de glucosa en los tejidos periféricos (Eid & Haddad, 2017).

Por otra parte, se ha reportado que las plantas que contienen compuestos fenólicos modulan la expresión de genes implicados en la señalización de la insulina y las vías de gluconeogénesis hepática (Kang et al., 2019), por lo que, se seleccionaron las decocciones de *I. sonorae* e *H. sabdariffa*, las cuales tuvieron los efectos más favorables en un modelo de obesidad inducido por dieta, para evaluar el efecto de estos tratamientos sobre la expresión relativa de genes de las vías gluconeogénicas en hígado y del transporte de glucosa en el tejido adiposo.

### **7.3. Efecto de las decocciones herbales sobre las expresiones relativa de genes**

#### **7.3.1. Genes relacionados con la vía gluconeogénica**

Estudios han indicado que los niveles de glucosa en sangre se mantienen mediante una estricta regulación de la captación de glucosa por los tejidos periféricos y de la producción de glucosa en el hígado (Samuel et al., 2009).

Los niveles de expresión de mRNA de *pck1* y *g6p* en el hígado de los animales de estudio se muestran en la Figura 14. Sorprendentemente, los resultados muestran que la expresión relativa de estos genes gluconeogénicos no aumentó en el grupo obeso en comparación con el grupo control.

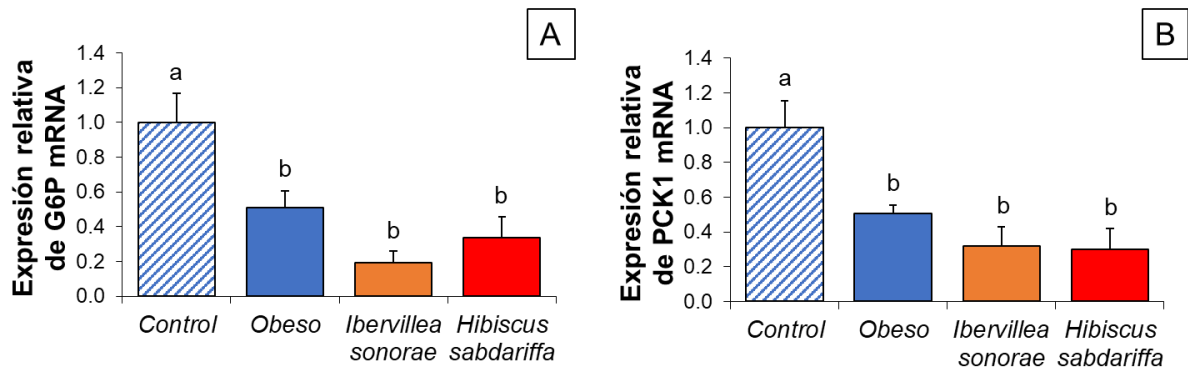


Figura 14. Expresión relativa de genes gluconeogénicos en tejido hepático. \*Indica diferencia estadística con respecto al grupo control. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Samuel et al. (2009) reportaron que la expresión hepática de enzimas gluconeogénicas en ratas con hiperglucemia leve no aumentó. Sin embargo, en el mismo estudio se observó una tendencia a incrementar la expresión de estas enzimas cuando aumentaba la severidad de la hiperglucemia. Nuestros resultados muestran que el grupo obeso incrementó los niveles de glucosa en suero comparado con el grupo control; sin embargo, también se observó que existe una secreción compensatoria de insulina, la cual podría estar relacionada con los resultados obtenidos.

Los niveles de expresión de mRNA de *pck1* y *g6p* en el hígado de ratas obesas tratadas con las decocciones de *I. sonorae* o *H. sabdariffa* no fueron diferentes comparando con el grupo obeso, lo que podría indicar que dichas decocciones no ejercen un efecto sobre la producción de glucosa hepática.

### 7.3.2. Genes relacionados con la cascada de señalización de la insulina

En condiciones de resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia prolongada suprime la respuesta adiposa debido a defectos en la expresión y función del transportador GLUT4. Además, un aumento de la fosforilación en los residuos de serina/treonina del receptor de sustrato de insulina se ha considerado como el principal mecanismo clave del desarrollo de la resistencia a la insulina (Petersen & Shulman, 2018). Los niveles de expresión de mRNA de *isr1* y en el tejido adiposo de los animales de estudio se muestran en la Figura 15.

Los resultados de qPCR muestran que los niveles de expresión de ARNm de *isr1* y *glut4* disminuyeron en el tejido adiposo de ratas obesas en comparación con el grupo control. Por lo que, estos resultados muestran una disminución del contenido superficial de GLUT4 e INSR, ambos factores relacionados con resistencia a la insulina asociada a obesidad.

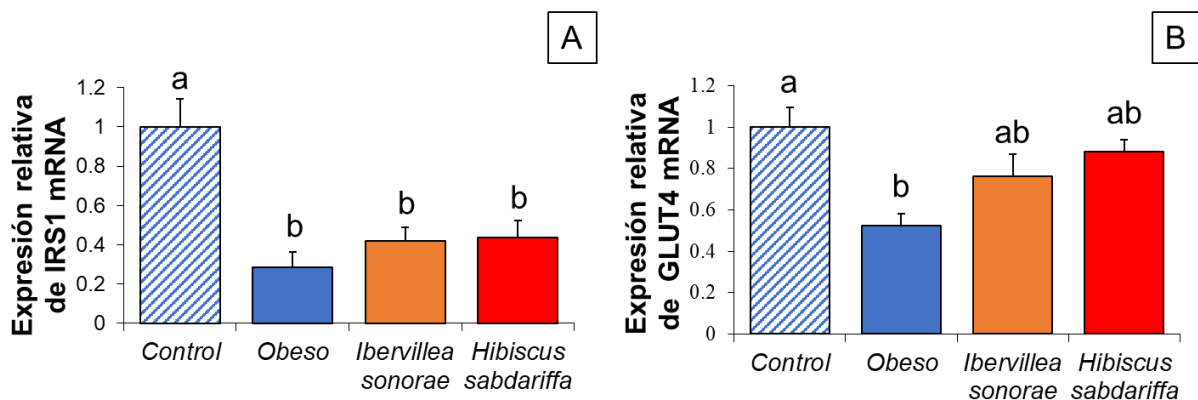


Figura 15. Expresión relativa de genes relacionados con la cascada de señalización de insulina en tejido adiposo. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Los tratamientos con las decocciones de *I. sonoreae* o *H. sabdariffa* lograron regular la expresión de *glut4* e *isr1* en el tejido adiposo de ratas obesas.

Zapata-Bustos et al. (2014) sugirieron que una mejora en la captación de glucosa mediante la activación de la vía de señalización de la insulina podría ser el mecanismo de acción de *I. sonorae* al observar que la estimulación de glucosa en células murinas fue prevenida por inhibidores del receptor de insulina, PI3K, AKT y GLUT4 en un modelo *in vitro*. Nuestros resultados sugieren que una mejora en la distribución y regulación de GLUT4 y una mejora en la respuesta a la insulina podría ser el mecanismo de acción por el cual los *I. sonorae* tienen un efecto positivo a la salud. Por otra parte, extractos metanólicos y fracciones de acetato de etilo y butanol de *H. sabdariffa* se han evaluado sobre la regulación *in vitro* de GLUT4 en miotubos L6. Sin embargo, los autores informaron que estos extractos no pudieron mejorar la regulación de GLUT4 en comparación con el grupo control. Nuestros resultados muestran que la administración de la decocción de *H. sabdariffa* mejora los niveles de expresión de *glut4*, lo que podría sugerir que los compuestos bioactivos presentes en la decocción podrían mejorar la expresión de GLUT4 en los adipocitos, mejorando la captación de glucosa (Shadhan et al., 2019).

#### **7.4. Efecto del consumo de las decocciones herbales sobre parámetros de daño en ratas alimentadas con dieta estándar**

##### **7.4.1. Peso corporal, consumo de alimento y morfología del tejido adiposo**

La popularidad del uso de plantas medicinales para prevenir o tratar diversas enfermedades ha crecido alrededor del mundo. Sin embargo, contrario a la creencia que se tiene de que el consumo de estos productos naturales es seguro, existen sustancias presentes en las plantas o en sus preparaciones que podrían no cumplir con las expectativas de seguridad para los consumidores (Craig et al., 2015). En este trabajo se evaluaron los posibles efectos adversos o indeseables asociados al consumo de las preparaciones tradicionales de *I. sonorae*, *J. spicigera*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* en ratas Wistar macho alimentadas con dieta comercial.

Durante el período experimental, no se observaron muertes o cambios anormales en el comportamiento en los grupos tratados con las decocciones herbales. Los grupos que consumieron las decocciones de *I. sonora*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* ganaron menos peso corporal que el grupo control. Sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Figura 16). El consumo de estas preparaciones a base de hierbas no afectó la ingesta de alimentos (Figura 17A), ni la ingesta de energía (Figura 17B) en los animales de estudio. Rivera-Ramírez et al. (2011) reportaron un posible efecto tóxico de *I. sonora* provocando pérdida de peso y una reducción del consumo de alimentos en ratones alimentados con dieta comercial. Sin embargo, en nuestro estudio no se observaron cambios evidentes en estos parámetros.

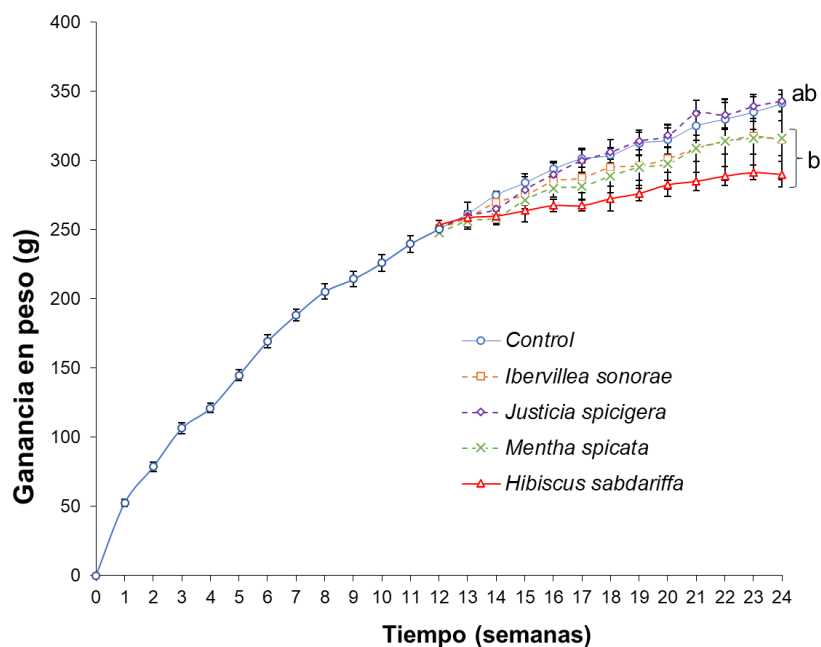


Figura 16. Ganancia de peso corporal en grupos alimentados con dieta comercial y tratados con las diferentes decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).



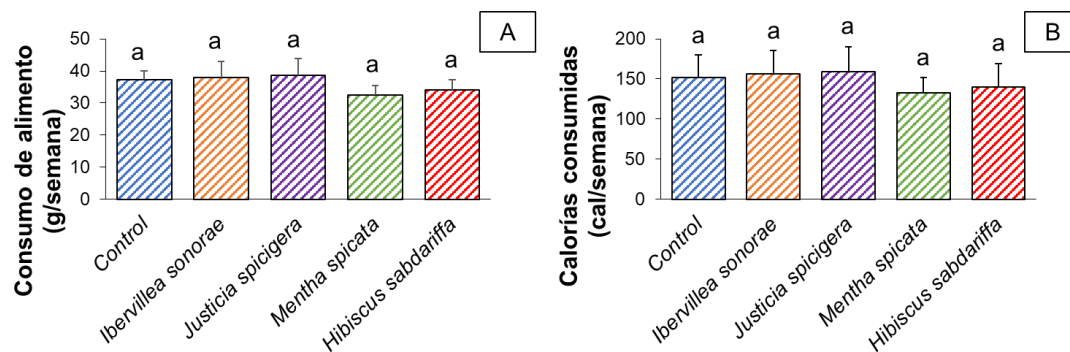


Figura 17. Consumo de A) alimento y B) energía en grupos alimentados con dieta comercial y tratados con las diferentes decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

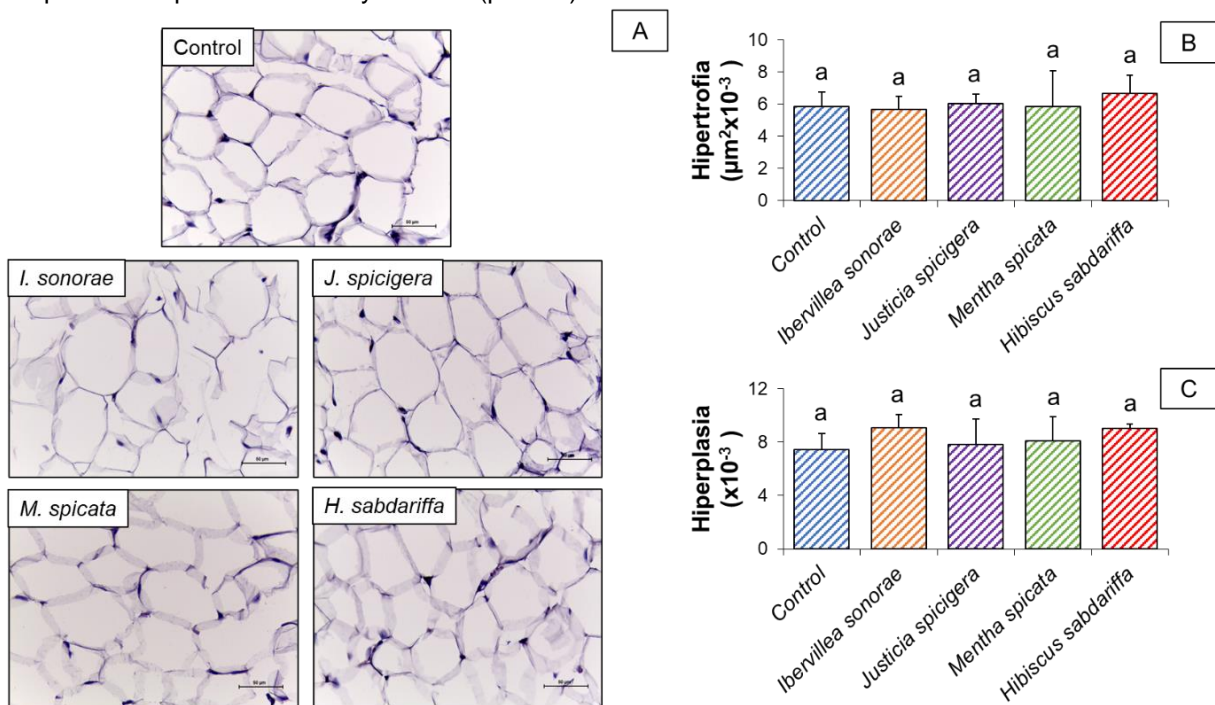


Figura 18. A) Micrografías representativas de secciones de tejido adiposo visceral (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre la B) hipertrofia e C) hiperplasia en adipocitos de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

El tejido adiposo de las ratas tratadas con las decocciones herbales no mostró cambios en la morfología de los adipocitos (Figura 18A), así como en la hipertrofia e hiperplasia (Figura 18B y 18C) comparado con el grupo de control, lo que concuerda con los resultados obtenidos en peso corporal y consumo de alimento, factores que no se modificaron con el consumo de las decocciones herbales.

#### 7.4.3. Efecto sobre la homeostasis de glucosa y los niveles de triglicéridos en suero

Las decocciones herbales no presentaron una diferencia estadística en la glucosa posprandial respecto al grupo control (Figura 19). Sin embargo, se observó que todas las decocciones herbales causaron una disminución de los niveles de glucosa en sangre, siendo más evidente en el grupo tratado con *H. sabdariffa* a los 60 min y el grupo tratado con *M. spicata* a los 120 min sin ninguna diferencia estadística. En el Cuadro 9 se muestran los niveles séricos de glucosa, insulina y triglicéridos, así como el cálculo del índice HOMA-IR. Nuevamente, las decocciones de *M. spicata* muestran una disminución significativa de los niveles de glucosa en suero cuando se compara con el grupo control. Los parámetros de insulina, triglicéridos e índice HOMA-IR no se modificaron con el consumo de las decocciones, siendo similares al grupo control.

Se ha reportado un posible efecto tóxico de *I. sonorae*. En estudios anteriores, se reportó que un extracto acuoso de *I. sonorae* (400 mg/kg) provocó un aumento en los niveles de triglicéridos en ratones alimentados con dieta comercial (Rivera-Ramírez et al., 2011). En nuestro estudio, las ratas alimentadas con dieta estándar que consumieron la decocción de *I. sonorae* (1002.8 mg/kg), no mostraron alteraciones en dichos parámetros. Estos resultados podrían deberse al material vegetal usado, ya que los autores emplearon una marca comercial que incluía la planta seca y pulverizada. Sin embargo, a menudo las compañías de productos herbales contienen otras mezclas de hierbas que alteran el producto y podrían producir efectos colaterales. Además, es importante tener una correcta identificación del material empleado de forma que garantice que el material y parte de la planta empleada en la medicina tradicional sean utilizadas bajo normas de calidad (Nunes et al., 2022).

Por otro lado, se ha reportado que el extracto etanólico de *J. spicigera* disminuye significativamente (27.7%) los niveles de glucosa en sangre en ratas normoglucémicas después de una ingesta oral de glucosa (Ortiz-Andrade et al., 2012). Sin embargo, no hay informes previos sobre decocciones de *J. spicigera* o extractos acuosos, la forma más común de consumo.

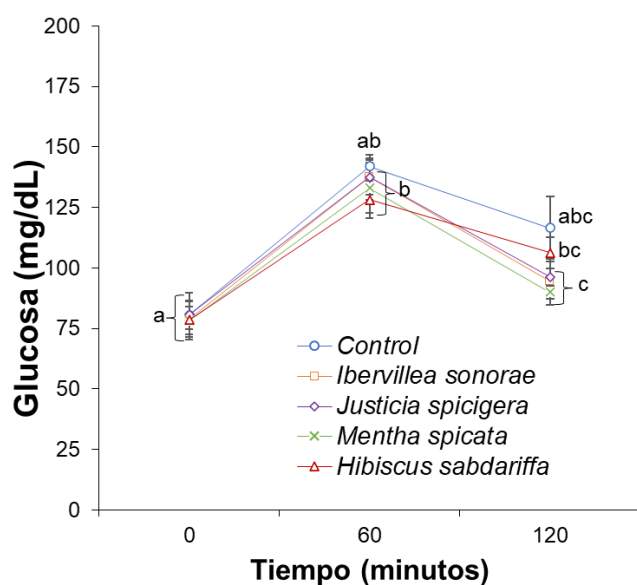


Figura 19. Efecto de las decocciones herbales sobre la prueba de tolerancia a la glucosa en grupos alimentados con dieta comercial. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 9. Efecto de las decocciones herbales sobre los niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos e índice HOMA-IR de ratas alimentadas con dieta estándar

Grupos	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)	Índice HOMA-IR	Triglicéridos (mg/dL)
Control	96.5±2.0 <sup>abcd</sup>	2.4±1.0 <sup>c</sup>	12.4±5.5 <sup>b</sup>	91.9±2.3 <sup>a</sup>
<i>Ibervillea sonorae</i>	85.8±7.1 <sup>cd</sup>	3.3±0.9 <sup>bc</sup>	15.7±4.3 <sup>ab</sup>	91.5±20.7 <sup>a</sup>
<i>Justicia spicigera</i>	94.4±10.3 <sup>bcd</sup>	3.4±0.7 <sup>bc</sup>	17.6±3.8 <sup>ab</sup>	105.2±23.7 <sup>a</sup>
<i>Mentha spicata</i>	78.3±8.4 <sup>d</sup>	3.7±0.4 <sup>abc</sup>	15.7±3.3 <sup>ab</sup>	120.1±7.5 <sup>b</sup>
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	83.4±6.2 <sup>cd</sup>	3.1±0.9 <sup>bc</sup>	14.1±4.6 <sup>b</sup>	81.4±13.4 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado previamente para *M. spicata* en donde se demostró una mejora en los niveles de glucosa en sangre en ratas normales, mientras que un extracto acuoso de *H. sabdariffa* no presentó ningún efecto en la prueba de tolerancia de glucosa en ratones alimentados con dieta comercial (Farid et al., 2018).

Entre los tejidos y órganos de los mamíferos, el hígado y el riñón parecen ser el predictor más sensible de toxicidad. Esto se debe a su participación en el metabolismo, desintoxicación y almacenamiento. Por lo tanto, se recomienda que se valore el peso y se realicen estudios histopatológicos para detectar posibles efectos tóxicos (Craig et al., 2015). La observación general del hígado y los riñones de las ratas tratadas con las decocciones herbales no mostraron cambios anormales en el color, tamaño, forma o textura en comparación con el grupo de control, sin embargo, los posibles efectos adversos en los órganos mencionados se detallan a continuación.

#### **7.4.4. Efecto de las decocciones de hierbas en la necrosis de las células hepáticas y el daño por colestasis**

La reacción adversa más común en suplementos que contienen hierbas, productos naturales y plantas empleadas en la medicina tradicional es la hepatotoxicidad, debido al papel del hígado en el metabolismo al mantener la homeostasis y realizar varias funciones como metabolizar diferentes compuestos tanto endógenos como exógenos, por tanto, tiene un mayor riesgo de presentar lesiones inducidas por la formación de metabolitos tóxicos (Nunes et al., 2022).

En la Figura 20 se muestra el peso relativo y absoluto del hígado, así como la cuantificación de triglicéridos en este tejido. Algunos de los efectos hepatotóxicos se manifiestan como un cambio en el peso del tejido, así como una acumulación anormal de grasa en los hepatocitos conocida como esteatosis (Calitz et al., 2018). En nuestro estudio, los grupos que consumieron las diferentes decocciones herbales *ad libitum* durante un periodo de 12 semanas no muestran cambios evidentes en estos parámetros.

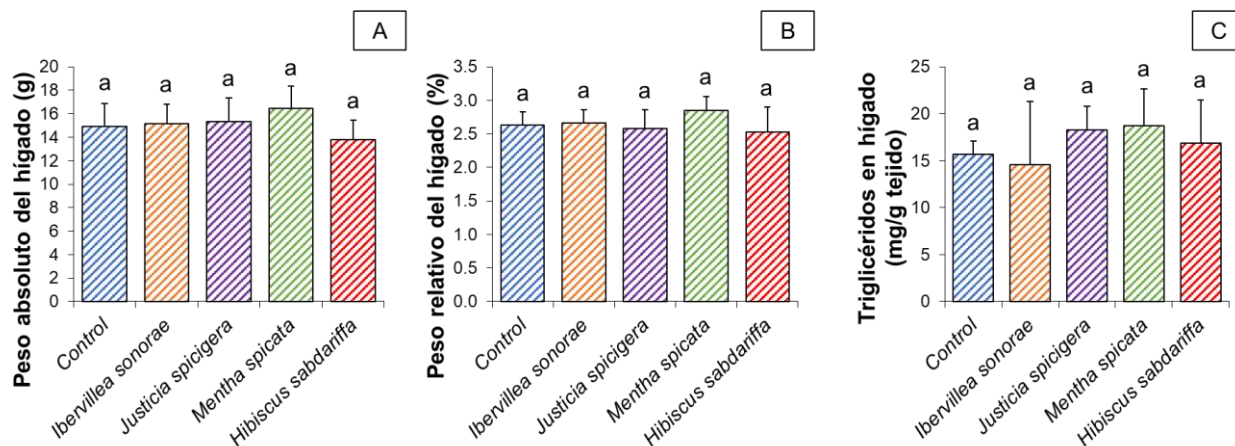


Figura 20. Pesos A) relativos y B) absolutos del hígado y C) contenido de triglicéridos hepáticos en grupos alimentados con dieta comercial y decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Otras alteraciones asociadas a hepatotoxicidad son cambios en la morfología del hepatocito, como presencia de gotas lipídicas, oclusión de las venas centrales y sublobulares, inhibición de bilis (colestasis), inflamación (hepatitis) y muerte celular (necrosis) (Calitz et al., 2018). Al final del experimento, se realizó un análisis histopatológico en el tejido hepático (Figura 21). Las micrografías no mostraron cambios evidentes en la arquitectura de los hepatocitos. En general, no se observó acumulación de gotas lipídicas, inflamación o necrosis (Figura 21A). En la Figura 21B se observa el conducto biliar (flechas naranjas), la arteria interlobular (flechas azules) y la vena porta (flecha negra), en donde no se observan alteraciones de la vía biliar ni infiltración de células inflamatorias en la zona portal.

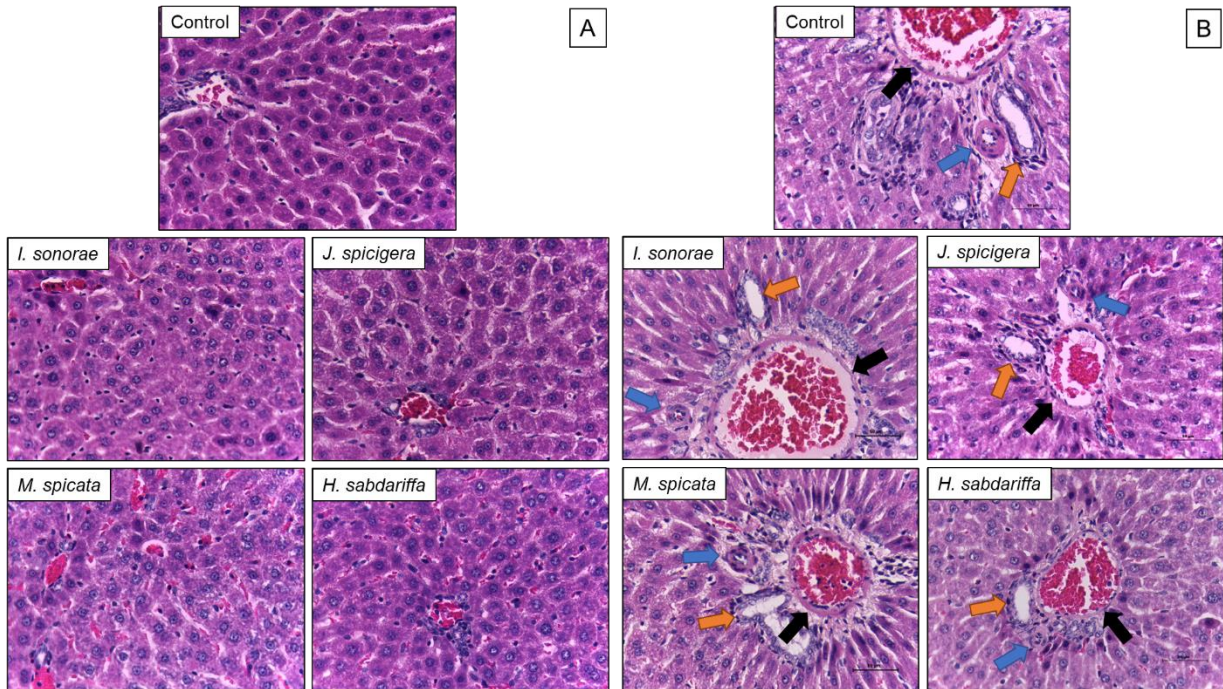


Figura 21. Micrografías representativas de secciones de tejido hepático (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre la A) morfología de los hepatocitos y B) la triada del portal: conducto biliar (flechas naranjas), arteria interlobular (flecha azul) y vena porta (flecha negra) de grupos alimentados con dieta comercial.

La lesión hepatocelular es más común, mientras que la colestasis es menos frecuente. La enfermedad hepática a menudo se refleja en anomalías bioquímicas. Parámetros bioquímicos, como los niveles de enzimas hepáticas: aspartato transaminasa (AST), alanina transferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) son parámetros relacionados con la integridad y el daño estructural de los hepatocitos y ayuda en el diagnóstico clínico de condiciones de toxicidad hepática (Zhang et al., 2021). Por lo tanto, se cuantificaron los niveles séricos de dichas enzimas en animales alimentados con dieta estándar, con la finalidad de observar algún efecto adverso con el consumo de las decocciones herbales.

En el presente estudio, no hubo cambios significativos en los niveles de AST, ALT o LDH en el suero de los animales tratados con las diferentes decocciones de hierbas en comparación con el grupo de control (Cuadro 10).

Cuadro 10. Parámetros relacionados con alteraciones de células hepáticas de ratas alimentadas con dieta estándar y decocciones herbales

Parámetros	Grupos				
	Control	<i>Ibervillea sonorae</i>	<i>Justicia spicigera</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
LDH (U/L)	322.0±17.2 <sup>a</sup>	245.0±100.7 <sup>a</sup>	303.7±22.2 <sup>a</sup>	297.7±114.5 <sup>a</sup>	346.5±32.0 <sup>a</sup>
AST (U/L)	38.8±2.9 <sup>a</sup>	34.6±7.2 <sup>a</sup>	37.6±3.0 <sup>a</sup>	32.7±8.8 <sup>a</sup>	33.5±10.8 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	8.2±1.7 <sup>a</sup>	8.5±1.8 <sup>a</sup>	7.8±1.0 <sup>a</sup>	9.0±1.4 <sup>a</sup>	9.1±1.5 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Estas enzimas están presentes en los hepatocitos y sus niveles aumentan como respuesta al daño celular. Mientras que AST se encuentra dentro de las células de diversos órganos y tejidos, ALT se localiza predominantemente en el hígado. Por lo que, en este estudio el consumo de las decocciones de *I. sonorae*, *J. spicigera*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* no está relacionado con alteraciones en la integridad y estructura de las células hepáticas.

En cuanto a los parámetros séricos relacionados con la colestasis hepática, se evaluaron los niveles de fosfatasa alcalina (ALP),  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT), bilirrubina total (TBIL) y bilirrubina conjugada (DBIL). Los resultados se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Parámetros relacionados con colestasis en células hepáticas de animales tratados con dieta estándar y decocciones herbales

Parámetros	Grupos				
	Control	<i>Ibervillea sonorae</i>	<i>Justicia spicigera</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
ALP (U/L)	19.1±2.4 <sup>b</sup>	29.8±5.9 <sup>a</sup>	31.9±2.7 <sup>a</sup>	32.3±3.7 <sup>a</sup>	28.6±5.3 <sup>a</sup>
GGT (U/L)	3.7±0.2 <sup>b</sup>	4.1±0.9 <sup>ab</sup>	6.2±2.6 <sup>ab</sup>	6.4±0.2 <sup>ab</sup>	3.2±2.6 <sup>b</sup>
TBIL (mg/dL)	3.8±1.6 <sup>a</sup>	7.0±1.7 <sup>a</sup>	5.9±2.3 <sup>a</sup>	4.9±1.6 <sup>a</sup>	4.8±1.8 <sup>a</sup>
DBIL (mg/dL)	2.0±1.2 <sup>a</sup>	1.6±0.1 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>	2.8±0.6 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

La colestasis es el impedimento del flujo de la bilis desde los hepatocitos al intestino, principalmente por una obstrucción o destrucción de los conductos biliares (Zhang et al., 2021). Por otro lado, se evaluaron parámetros relacionados con colestasis como los niveles de fosfatasa alcalina (ALP) y gamma-glutamilttransferasa (GGT).

Los niveles de ALP aumentaron significativamente en todos los grupos tratados ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, ALP es una enzima que se encuentra en diversos tejidos como: hueso, hígado, placenta, intestino y riñón; su presencia también está asociada a un origen óseo por lo que su incremento sérico podría estar asociado con un origen no hepático.

GGT es una enzima que se localiza en la mayoría de las células del organismo, principalmente en células hepáticas. Además, el principal uso clínico de GGT es confirmar el origen hepático de ALP cuando este se encuentra elevado en suero. Cuando el hígado está dañado, GGT puede filtrarse a la sangre y sus niveles altos indican una enfermedad hepática o un daño en las vías biliares (Zhang et al., 2021). Respecto a los animales tratados con las decocciones de *I. sonorae*, *J. spicigera* o *M. spicata* se observa un aumento en los niveles de GGT, sin embargo, estos valores no mostraron diferencias estadísticas con el grupo control.

Niveles séricos elevados de ALP y GGT podrían indicar que se está produciendo colestasis; en esta situación es frecuente encontrar un aumento de la bilirrubina (Zhang et al., 2021). Para descartar un daño en las vías biliares provocado por el consumo de las decocciones se cuantificaron los niveles de bilirrubina total (TBIL) y bilirrubina conjugada (DBIL).

La TBIL es un producto de desecho de los glóbulos rojos que el hígado elimina por la bilis al intestino, para eliminarla se presentan procesos de conjugación en la cual se obtiene la bilirrubina conjugada (DBIL), ambos parámetros son importantes para evaluar la función excretora del hígado y evaluar una posible anemia hemolítica (Zhang et al., 2021).



En este estudio, no se observaron diferencias estadísticas en estos parámetros relacionados con colestasis: TBIL y DBIL, en los grupos tratados con las decocciones comparados con el grupo control. Estos resultados sugieren que el consumo de las decocciones de *I. sonorae*, *M. spicata* o *H. sabdariffa* no produjeron daño al hígado asociado a conductos biliares en los animales de estudio. Además, los niveles elevados de GGT en el grupo tratado con *J. spicigera* podría estar indicando un daño en hígado que no es debido a una obstrucción en las vías biliares.

Por otra parte, la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos y las proteínas de membrana es considerada un importante mecanismo de toxicidad (Nafiu et al., 2019). En las Figuras 22A y 22B se muestra el efecto de las diferentes decocciones herbales sobre los niveles de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas en tejido hepático de las ratas alimentadas con dieta estándar. Los resultados no muestran diferencias en los niveles de peroxidación lipídica en hígado (Figura 22A). Sin embargo, el grupo tratado con la decocción de *J. spicigera* presenta niveles elevados de oxidación de proteínas, lo cual podría explicar los niveles elevados de GGT (Figura 22B).

En estudios anteriores, Nwachukwu et al. (2015) reportaron una disminución de peso y daño hepático a 1000 mg/kg de *H. sabdariffa*. En nuestro estudio, las ratas alimentadas con dieta estándar consumieron aproximadamente 2184.3 mg/kg de *H. sabdariffa*, lo que equivale a 700 mL diarios de la decocción de *H. sabdariffa* para una persona de 60 kg. A pesar de esto, no se observaron alteraciones en los parámetros medidos.

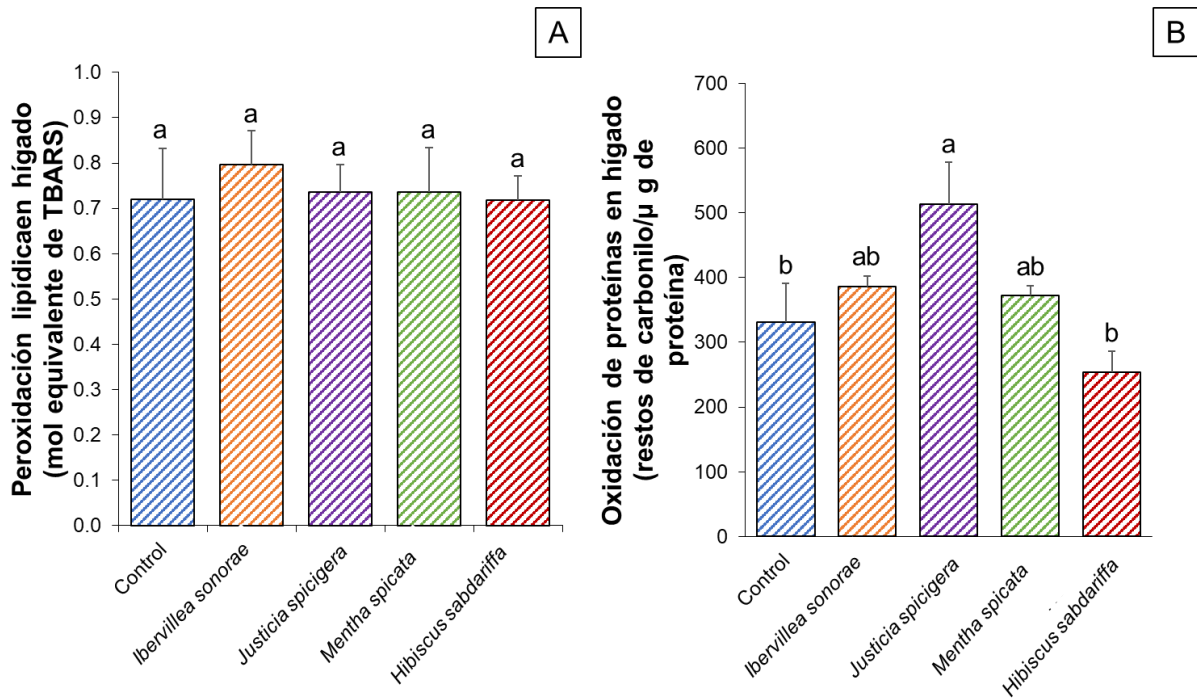


Figura 22. Efecto de las decocciones herbales sobre la peroxidación de lípidos (A) y oxidación de proteínas (B) en hígado de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

#### 7.4.5. Efecto de las decocciones hierbales en los parámetros de la función renal

El peso absoluto y relativo del riñón no presentó diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos (Figura 23A y 23B). En general, las secciones renales de todos los animales de estudio mostraron una arquitectura histológica normal ya que no se observó inflamación, dilatación o necrosis en los túbulos renales, congestión glomerular o hemorragia (Figura 24A). El análisis histomorfométrico mostró un área de glomérulo normal (Figura 24B) y espacio normal de Bowman entre todos los grupos (Figura 24C). Por lo anterior, se evaluaron parámetros de función renal en orina y suero de los animales alimentados con dieta estándar, con la finalidad de evaluar el posible efecto adverso del consumo prolongado de decocciones herbales.

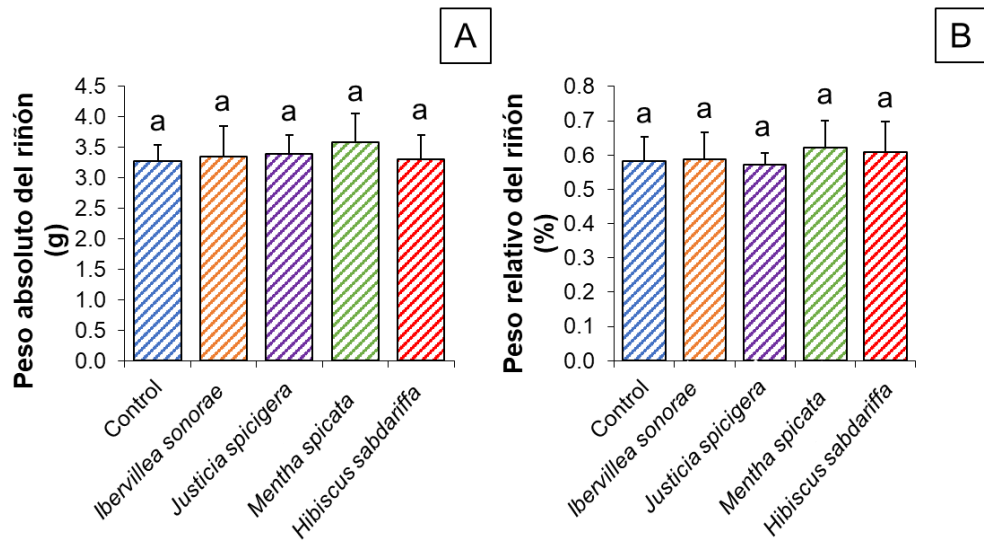


Figura 23. Pesos A) relativos y B) absolutos de riñones en ratas alimentados con dieta comercial y decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

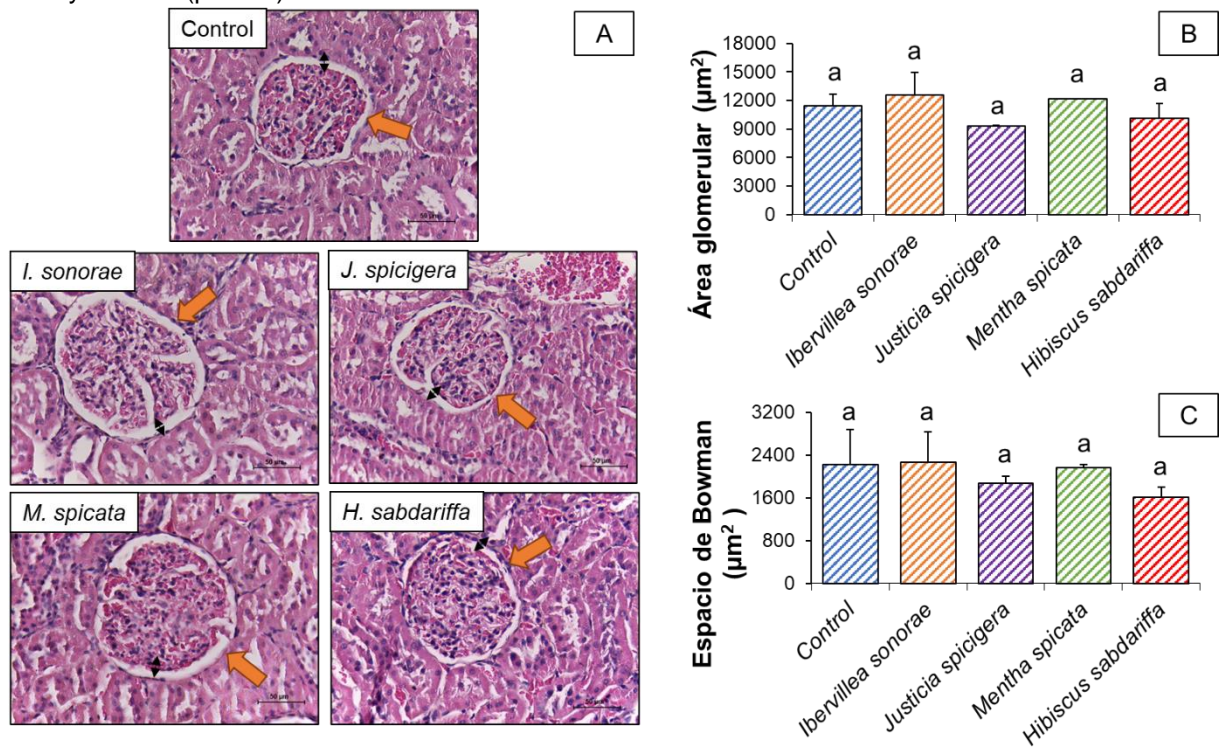


Figura 24. A) Micrografías representativas de secciones de tejido renal (X40). Efecto de las decocciones herbales sobre el B) área glomerular y C) el espacio de Bowman de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

Los riñones tienen un papel vital en la excreción de productos de desecho y toxinas como urea, creatinina y ácido úrico. La urea es un compuesto que contiene nitrógeno que se forma en el hígado como producto final del metabolismo de las proteínas y del ciclo de la urea. Aproximadamente el 85% de la urea se elimina por vía renal, el resto se excreta a través del tracto gastrointestinal (Luyckx, 2012). En nuestro estudio, los niveles de urea sérica no mostraron cambios en los animales tratados con decocciones herbales y el grupo control (Cuadro 12). Se observó un incremento en la excreción urinaria de urea en los animales que consumieron las decocciones herbales. Los niveles de urea sérica tienden a aumentar en condiciones en las que el aclaramiento renal disminuye, por lo que estos resultados indican que las decocciones herbales contribuyen a que los riñones filtren correctamente la urea de la sangre.

La creatinina sérica es un indicador posterior de insuficiencia renal: la función renal disminuye en un 50% antes de que se observe un aumento de la creatinina sérica (Kashani et al., 2020). En los animales que recibieron decocciones herbales se observa un incremento en las concentraciones de creatinina en suero. La creatinina tiene un peso molecular bajo y no se une a la albumina, por lo que se filtra libremente a nivel del glomérulo. Además, la creatinina puede ser secretada por los túbulos proximales mediante vías secretoras aniónicas o catiónicas. Se ha reportado que algunos medicamentos como los salicilatos pueden inhibir la secreción tubular de creatinina y por tanto sobreestimar los niveles de creatinina sérica (Kashani et al., 2020). Además, se ha reportado que los niveles séricos de estos parámetros pueden aumentar en otras afecciones no relacionadas con enfermedades renales, como deshidratación (Luyckx, 2012). Por lo que las elevaciones de los niveles de urea o creatinina en suero podrían no indicar necesariamente una enfermedad renal.

Cuadro 12. Parámetros de daño renal de ratas alimentadas con dieta estándar y decocciones herbales

Parámetros	Grupos				
	Control	<i>Ibervillea sonorae</i>	<i>Justicia spicigera</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
Suero					
BUN (mmol/L)	3.6±0.1 <sup>a</sup>	3.5±0.5 <sup>a</sup>	3.2±0.5 <sup>a</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>	3.0±0.8 <sup>a</sup>
Creatinina (μmol/L)	30.9±9.7 <sup>a</sup>	55.6±14.1 <sup>ab</sup>	75.8±11.9 <sup>b</sup>	58.9±11.9 <sup>ab</sup>	57.2±15.1 <sup>ab</sup>
Ácido úrico (mg/dL)	2.7±0.6 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	2.4±0.6 <sup>a</sup>	2.2±0.6 <sup>a</sup>	1.7±0.2 <sup>a</sup>
Orina					
Urea (mmol/L)	983.8±300.0 <sup>b</sup>	1414.1±134.4 <sup>ab</sup>	1172.5±350.4 <sup>ab</sup>	1264.0±337.1 <sup>ab</sup>	1472.7±266.1 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	73.5±5.9 <sup>b</sup>	131.8±31.6 <sup>b</sup>	105.6±65.2 <sup>b</sup>	150.6±58.7 <sup>b</sup>	317.6±78.3 <sup>a</sup>
Ácido úrico (mg/dL)	20.7±10.2 <sup>c</sup>	36.2±5.4 <sup>bc</sup>	35.7±6.9 <sup>bc</sup>	42.9±7.8 <sup>ab</sup>	57.8±10.6 <sup>a</sup>
Proteína (mg/mL)	21.9±9.8 <sup>a</sup>	35.6±12.8 <sup>a</sup>	27.2±12.7 <sup>a</sup>	26.0±8.6 <sup>a</sup>	34.0±11.1 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

En nuestro estudio, no se observó un incremento de urea sérica, ni una disminución de la excreción urinaria de creatinina y urea. Se ha reportado que concentraciones elevadas de creatinina en orina indican deshidratación (Luyckx, 2012), por lo que un aumento de estos parámetros en orina podría estar relacionado a la deshidratación, debido a que las ratas en estudio consumieron las decocciones como agua de uso. El consumo de la decocción de *H. sabdariffa* fue el más bajo, lo que explicaría la concentración elevada de creatinina.

Un incremento de ácido úrico en suero se asocia fuertemente con el desarrollo de trastornos cardiovasculares e insuficiencia renal (Mehmood et al., 2019). En nuestro estudio no se observan diferencias en los niveles séricos de ácido úrico en los diferentes grupos. Así mismo, los animales tratados con decocciones incrementan la excreción urinaria de ácido úrico, teniendo relevancia estadística los grupos que consumieron las decocciones de *M. spicata* o *H. sabdariffa*. En estudios anteriores, se ha reportado que los polifenoles provenientes de algunas plantas tienen el potencial de disminuir la hiperuricemia al reducir la síntesis de ácido úrico a través del bloqueo de la xantina oxidasa, o bien incrementando la excreción de ácido úrico en orina previniendo así su reabsorción en el riñón (Mehmood et al., 2019). Por lo anterior, el tratamiento con las decocciones herbales podría estar inhibiendo la reabsorción del exceso de ácido úrico, por lo cual aumenta su excreción en orina.

Un marcador importante del daño glomerular es la proteinuria, que resulta de una ruptura en la barrera de filtración glomerular. Un aumento de proteína en orina podría reflejar una lesión en el glomérulo y en el túbulo intersticial (Luyckx, 2012). Los niveles de albúmina en orina fueron similares en los diferentes grupos de estudio.

Los radicales libres que se generan con el consumo de las decocciones destruyen los componentes lipídicos y proteicos de la membrana celular renal por peroxidación o desnaturalización de proteínas provocando disfunción (Nafiu et al., 2019). En las Figuras 25A y 25B se muestra el efecto de las diferentes decocciones herbales sobre los niveles de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas en tejido renal de las ratas alimentadas con dieta estándar. No se observaron diferencias en los niveles de peroxidación lipídica u oxidación de proteínas. Por lo tanto, las decocciones herbales presentan una alteración en los niveles de creatinina, misma que no es reflejada en la evaluación histológica, ni en otros parámetros evaluados.

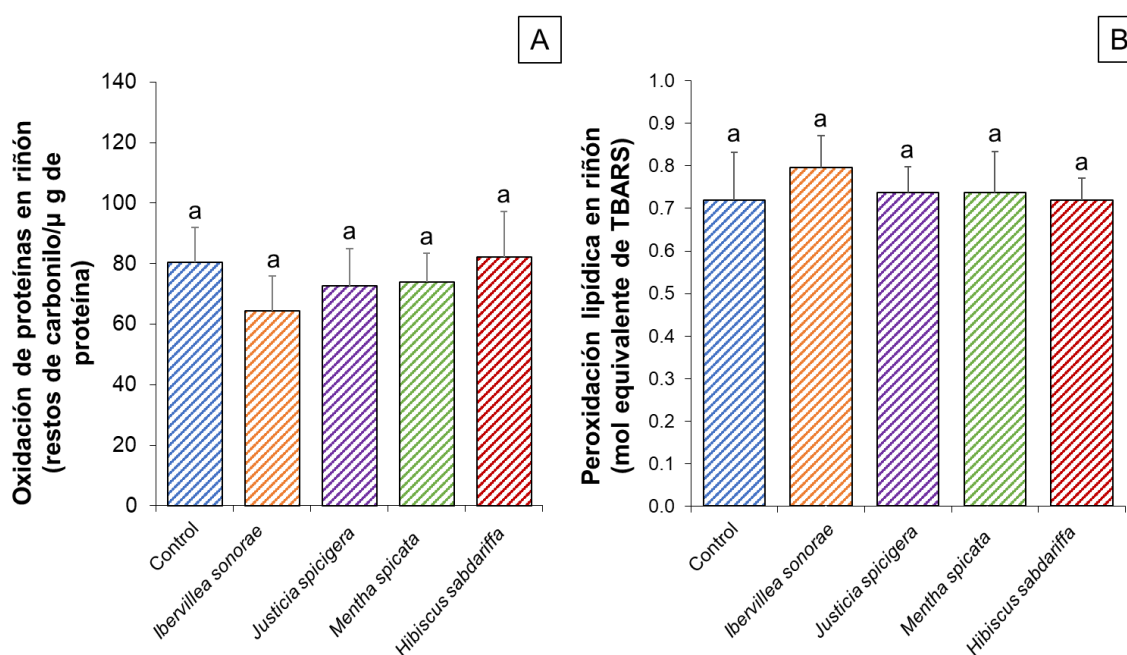


Figura 25. Efecto de las decocciones herbales sobre la oxidación de proteínas en riñón de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

#### 7.4.6. Efecto de las decocciones de hierbas en el daño del colon

Un mayor riesgo de desarrollar una inflamación crónica en el colon está asociado con el aumento en la ingesta dietética de grasas totales, grasas animales y ácidos grasos poliinsaturados (Gajendran et al., 2019).

No se observaron cambios patológicos como necrosis celular, inflamación, degeneración tisular, ulceración o fibrosis en las secciones de colon teñidas con H&E. Las secciones de colon de todos los grupos mostraron una arquitectura histológica normal, con criptas que contenían abundantes células calciformes (Figura 26A y 26B).

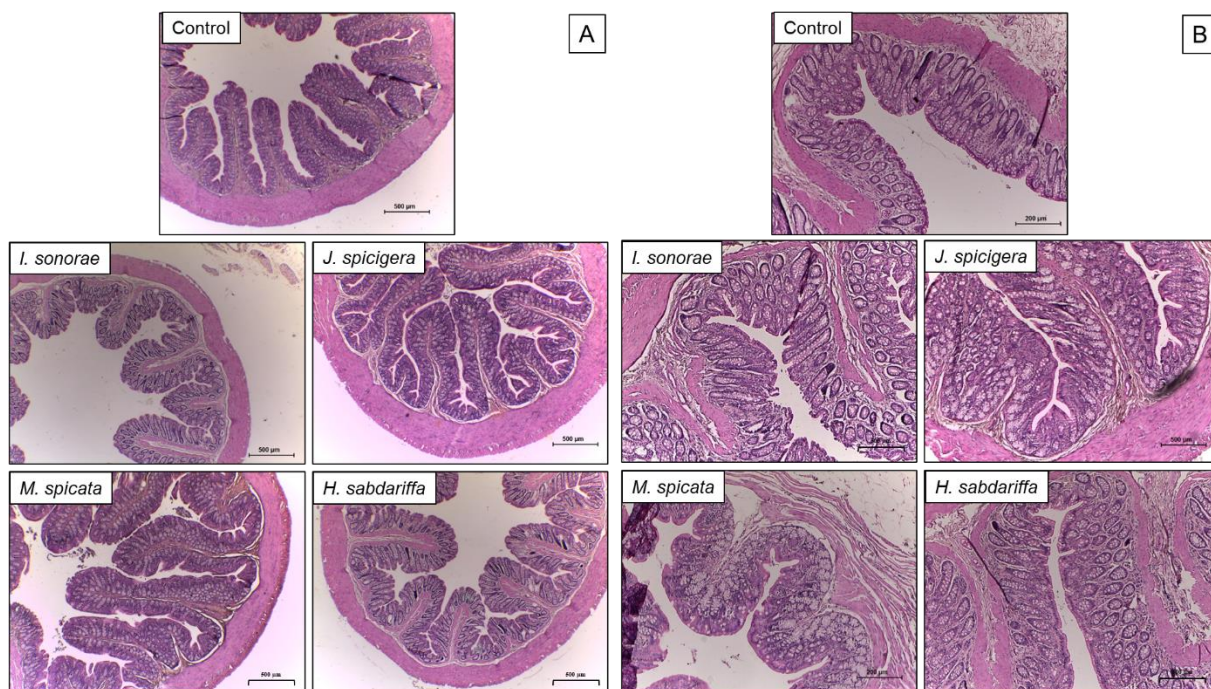


Figura 26. Micrografías representativas de secciones de colon A) X10 y B) X40 de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales.

Las mediciones histomorfométricas de la túnica mucosa, la profundidad de la cripta y el número de células globulares en el colon de los grupos tratados no mostraron diferencias cuando se compararon con el grupo de control (Figuras 27A, B y C). Cambios en dichos parámetros evaluados en la morfología intestinal podrían estar comprometiendo la función del colon. La administración de las decocciones no afectó el grosor de la túnica mucosa, la profundidad de la cripta o el número de células calciformes. Se sabe que un aumento en estas medidas podría afectar de una forma positiva las actividades digestivas y de absorción (Ünsal et al., 2018).

En nuestro estudio, las ratas alimentadas con dieta estándar consumieron aproximadamente 1002.8 mg/kg de la decocción de *I. sonorae*, lo que equivale a 1000 mL diarios de esta decocción acuosa para una persona de 60 kg.



No se observaron alteraciones en los parámetros medidos en ratas alimentadas con dieta estándar.

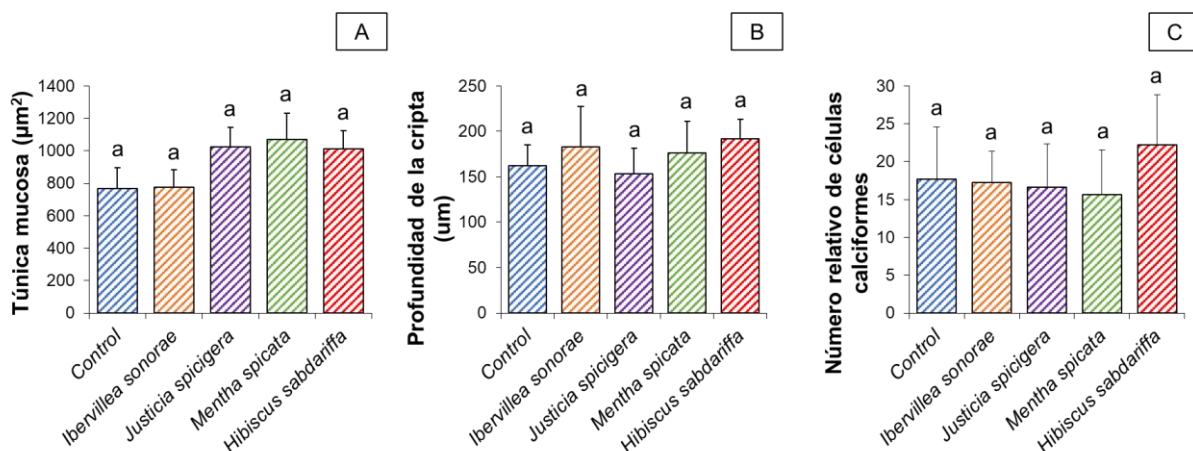


Figura 27. Efecto de las decocciones herbales sobre A) la túnica mucosa, B) la profundidad de la cripta y C) el número relativo de células calciformes del tejido colónico de ratas control y ratas tratadas con las decocciones herbales. Letras diferentes indican diferencia estadística empleando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

## 7.5. Análisis metabólico en el tejido hepático de los animales de estudio

Los datos obtenidos en el equipo UPLC/MS se adquirieron mediante el software UNIFI, en donde se procesaron y se realizó la corrección de masas. Posteriormente, los datos fueron importados y procesados empleando el software Progenesis Q1, en donde se llevó a cabo el proceso de alineación que permite corregir los tiempos de retención usando un control de calidad (QC) como referencia. Se encontraron 17213 señales en modo de ionización positivo y 13576 en modo negativo. Posteriormente se realizó el proceso de deconvolución y se obtuvieron un total de 3223 señales en modo positivo y 3866 señales en modo negativo. Los datos fueron exportados y se realizaron los análisis quimiométricos empleando la plataforma de MetaboAnalyst 5.0. Para la normalización de datos, se emplearon las siguientes categorías: 1) Normalización de la muestra por suma, 2) transformación de datos (Log base 10) y, 3) escala de datos por Pareto (centrado en la media/raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable).

Posteriormente se empleó un análisis no supervisado de componentes principales (PCA) para observar las tendencias de clasificación. Es de importancia señalar que la estabilidad del método analítico es crucial para garantizar la obtención de datos metabolómicos aceptables (Liu et al., 2020), por lo que dicha estabilidad y precisión se evaluaron visualmente con las muestras de control de calidad (QC). En las Figuras 28A y 28B se muestra el análisis de todas las muestras que se inyectaron en el sistema en ambos modos de ionización. Se puede observar que las muestras denominadas QC (cuadrado rosa) se encuentran estrechamente agrupadas en ambos modos, lo que valida la estabilidad del sistema y por tanto la confiabilidad de los datos metabolómicos (Chen et al., 2022).

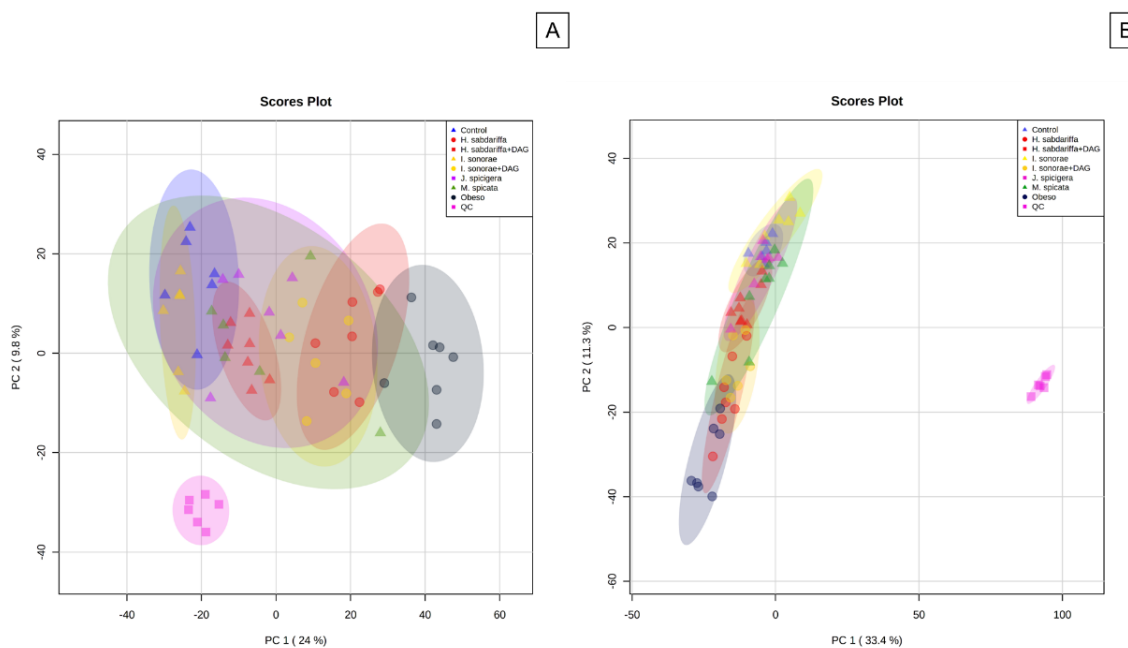


Figura 28. Análisis multivariante de componentes principales de los grupos de estudio. Grupo control (triángulos azules), DC+*I. sonorae* (triángulos amarillos), DC+*J.spicigera* (triángulos morados), DC+*M. spicata* (triángulos verdes), DC+*H. sabdariffa* (triángulos rojos), grupo obeso (círculos azules), DAGF+*I. sonorae* (círculos amarillos), DAGF+*H. sabdariffa* (círculos rojos), muestras de control de calidad (cuadrados rosas). A) Modo positivo, B) Modo negativo.

De forma general, en la Figura 28A se observa que el grupo obeso (círculos azules) se separa del grupo control (triángulos azules). Además, los grupos de ratas alimentadas con dieta estándar y tratadas con las diferentes decocciones herbales (triángulos) tienden a agruparse más cerca del grupo control.

Mientras que los grupos obesos tratados con las decocciones de *H. sabdariffa* (círculos rojos) o *I. sonorae* (círculos amarillos) se encuentran agrupados entre el grupo obeso y el grupo control. La varianza de los grupos es representada por los primeros dos componentes principales, donde PC1=24% y PC2=9.8% para el modo positivo y PC1=33.4% Y PC2=11.3% para el modo negativo.

La finalidad de emplear el análisis metabolómico es primeramente comparar los perfiles de metabolitos entre el grupo control y el grupo obeso y los grupos obesos tratados con las decocciones que obtuvieron un efecto fisiológico favorable (*I. sonorae* o *H. sabdariffa*). Posteriormente comparar los perfiles del grupo control con los grupos alimentados con dieta estándar y tratados con las diferentes decocciones con la finalidad de evaluar algún posible efecto adverso.

#### **7.5.1. Análisis metabolómico en hígado de ratas control y ratas obesas tratadas con las decocciones herbales**

En la actualidad, los métodos de medición de salud implican la combinación de herramientas analíticas para medir moléculas pequeñas, hormonas u otras sustancias (McNiven et al., 2011). Como se observó en secciones anteriores de este trabajo, el consumo de *H. sabdariffa* fue la única decocción que previno la ganancia de peso corporal (Figura 6). Además, el consumo de *H. sabdariffa* o *I. sonorae* mostraron disminuir la hipertrofia en adipocitos (Figura 8), el contenido de triglicéridos en hígado y suero (Figura 9, Cuadro 7) y mejorar la homeostasis de glucosa al disminuir la resistencia a insulina (Sección 7.2.7) en ratas obesas alimentadas con una dieta hipercalórica. Contrario a los resultados mostrados para las decocciones de *J. spicigera* o *M. spicata*, en donde no se observaron diferencias marcadas con respecto al grupo control obeso. En ese sentido, el análisis metabolómico estudia la composición de metabolitos de un sistema (célula u organismo), lo que permite no solo identificar, sino también relacionar cambios específicos en el metaboloma con las respuestas fisiológicas descritas anteriormente (McNiven et al., 2011).

Por lo anterior, se seleccionaron muestras de hígado del grupo control, grupo obeso y grupos obesos tratados con las decocciones herbales de *I. sonorae* o *H. sabdariffa* para evaluar el perfil metabólico no dirigido y poder comparar estados de enfermedad o respuesta a los tratamientos que obtuvieron las mejores respuestas benéficas a la salud. Los datos fueron agrupados en un mapa de calor, lo que permite visualizar las diferencias y similitudes entre los grupos experimentales según un análisis de ANOVA y distancia euclidiana. El color de cada celda corresponde a la concentración de cada posible compuesto por individuo. En las Figuras 29A y 29B se detectaron dos agrupaciones principales en ambos modos de ionización en donde se observa que los animales que consumieron una dieta hipercalórica se agrupan correctamente y presentan un perfil metabólico diferente a los animales que consumieron una dieta estándar (grupo control). Además, es importante destacar que el perfil de metabolitos de los animales que consumieron una dieta hipercalórica y fueron tratados con las decocciones herbales se separan completamente del grupo obeso en ambos modos de ionización. Estos resultados indican que el tratamiento con las decocciones herbales regula la concentración de metabolitos, cambiando su perfil completamente.

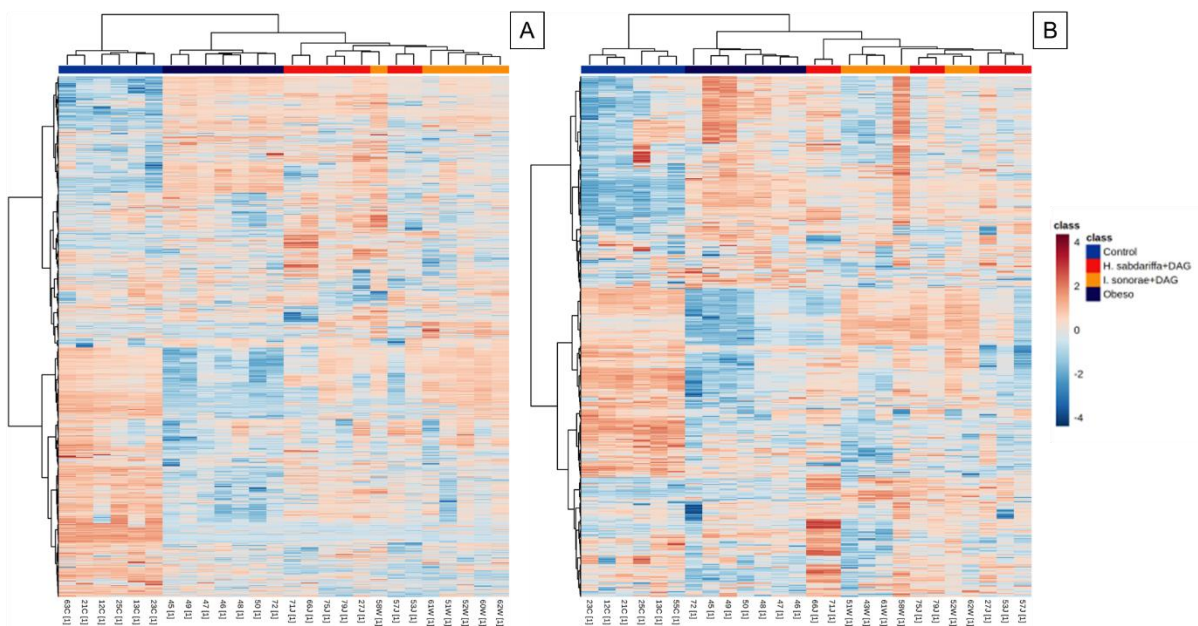


Figura 29. Mapa de color A) Modo positivo, B) Modo negativo.

Además, se observa que los animales obesos tratados con *I. sonoreae* o *H. sabdariffa* no logran separarse del todo. Estos resultados sugieren que ambos tratamientos comparten metabolitos en común lo que indica que podrían estar teniendo mecanismos de acción similares.

La técnica de regresión de mínimos cuadrados parciales con análisis discriminante (PLS-DA) es un método supervisado en el que se obtiene información sobre las muestras de cada grupo, por lo que es posible distinguir diferencias entre grupos y mejorar la validez y la capacidad analítica. En las Figuras 30A y 30B se observan las gráficas de puntuación PLS-DA en ambos modos de ionización empleados para identificar si el perfil metabolómico permite la discriminación entre los diferentes grupos de estudio. Las puntuaciones de los 2 componentes principales indicaron una varianza explicada del 30.2% (componente 1) y 6.7% (componente 2) para el modo de ionización positivo (Figura 30A). Mientras que la puntuación de los componentes principales para el modo negativo fue de 33.7% (componente 1) y 8.8% (componente 2) (Figura 30B).

En ambos modos, se observa que el grupo control está claramente discriminado del grupo obeso, lo que indica que una dieta hipercalórica se asocia con alteraciones en el metaboloma hepático. Además, se puede apreciar que el grupo obeso tratado con *H. sabdariffa* está claramente discriminado del resto de los grupos en el modo de ionización positiva. Mientras que dicho grupo se encuentra entre el grupo obeso y el grupo control en el modo de ionización negativa. Estos datos confirman que 12 semanas de tratamiento con esta decocción fueron suficientes para cambiar el estado metabólico de las ratas obesas que presentaban ya alteraciones metabólicas, como se observó anteriormente, en donde se confirmó una mejora de la resistencia a insulina, comparable con el grupo control. Por otro lado, el grupo obeso tratado con *I. sonorae* se localiza entre el grupo obeso y el grupo control en el modo de ionización positiva. Mientras que dicho grupo se encuentra superpuesto con el grupo obeso en el modo de ionización negativa. Estos resultados podrían deberse al efecto anteriormente descrito, en donde se refleja una mejora en los niveles de triglicéridos y glucosa de las ratas obesas.

Para evaluar el modelo, se empleó una validación cruzada LOOCV, en donde se obtuvieron los siguientes valores:  $R^2=0.99384$  y  $Q^2=0.90219$ , para el modo positivo y  $R^2=0.98372$  y  $Q^2=0.90229$  para el modo negativo. Además, el modelo se evaluó mediante una prueba de permutación (100) con  $p>0.01$ . El poder predictivo del modelo es reflejado por la diferencia entre  $R^2$  (que tan bien predice el modelo los datos de calibración) y  $Q^2$  (que tan bien predice el modelo nuevos datos (Bevilacqua & Bro, 2020)). Nuestros resultados sugieren que el modelo proporciona una visualización significativa.

Se obtuvieron los valores de puntuación (VIP) de los metabolitos responsables de los agrupamientos observados en la gráfica de PLS-DA. En las Figuras 31A y 31B se muestran las primeras puntuaciones VIP que permiten visualizar la contribución que cada metabolito hace al modelo. Los valores de puntuación  $VIP>2$  se consideraron como influyentes en el modelo de PLS-DA. Se obtuvieron 106 metabolitos en ionización positiva y 21 metabolitos en ionización negativa.

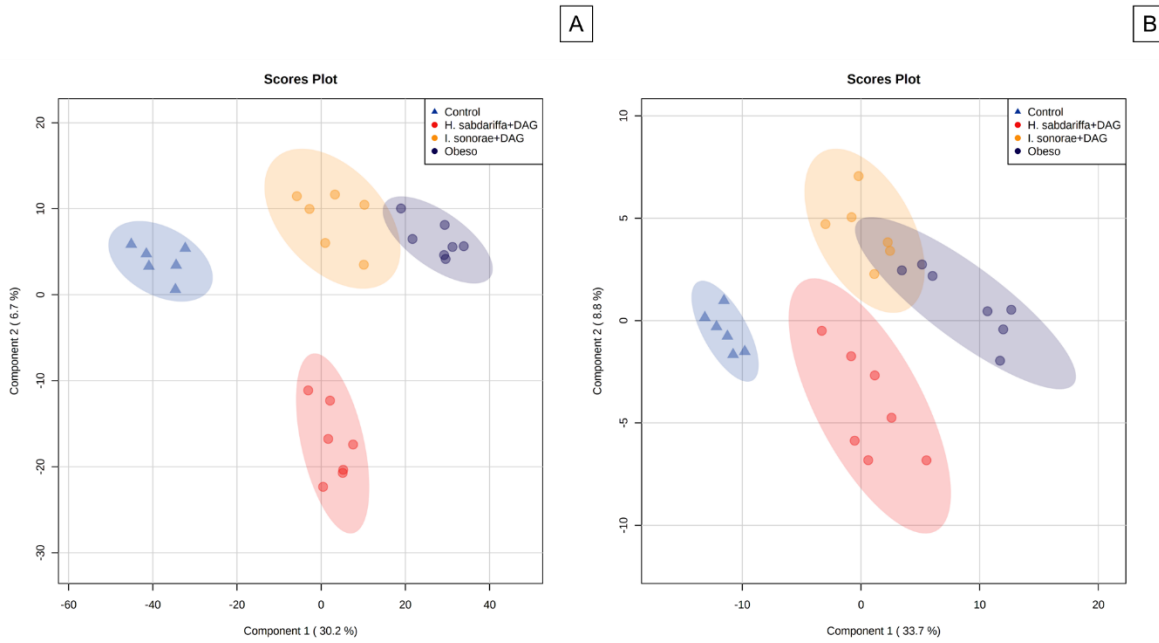


Figura 30. Análisis multivariado de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) del grupo control (triángulos azules), grupo obeso (círculos azules) y grupos obesos tratados con las decocciones de *I. sonorae* (círculos naranjas) o *H. sabdariffa* (círculos rojos). A) Modo positivo, B) Modo negativo.

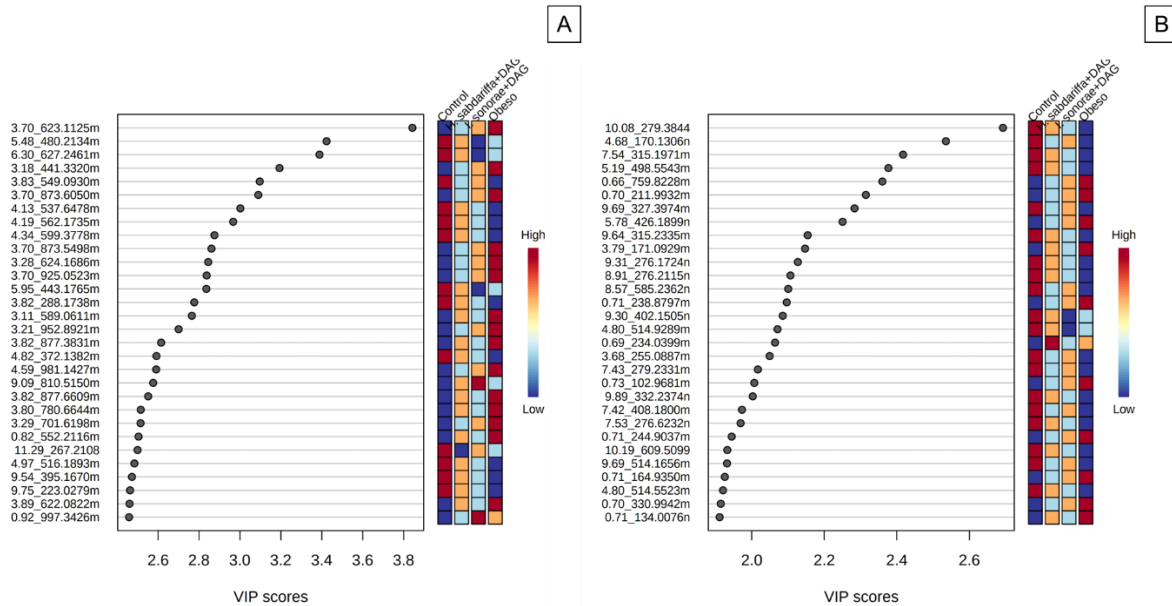


Figura 31. Diagrama de puntuación VIP de los metabolitos hepáticos de los grupos: control, obeso, obeso tratado con *I. sonorae* y obeso tratado con *H. sabdariffa*.

### 7.5.2. Análisis metabolómico en hígado de ratas alimentadas con dieta estándar y tratadas con las decocciones herbales

En la Figura 32A y 32B se muestran los mapas de calor, en los que se presenta el perfil de metabolitos para cada grupo. Se observan 2 grupos principales en el modo de ionización positivo, uno conformado por los individuos que pertenecen al grupo control, al grupo tratado con *I. sonorae* y al menos dos individuos tratados con *J. spicigera* o *M. spicata*. Por otro lado, el segundo grupo está conformado por animales que fueron tratados con *J. spicigera*, *M. spicata* o *H. sabdariffa*, en donde este último se agrupa fuertemente. Anteriormente, Amaya-Cruz et al. (2019) identificaron compuestos polifenólicos extraíbles en cálices de *H. sabdariffa* empleando UPLC-ESI-QTOF/MS, en donde las características cromatográficas utilizadas fueron similares, reportando la presencia de antocianinas en el modo positivo. En el Cuadro 6, se observó una mayor cantidad de antocianinas totales en los extractos de *H. sabdariffa*, seguida de las decocciones de *J. spicigera* y *M. spicata*, en donde *I. sonorae* fue la decocción con menor concentración de estos compuestos, lo cual podría sugerir que dicha separación se debe a metabolitos exógenos presentes en las decocciones de *H. sabdariffa*, *J. spicigera* o *M. spicata*. Por otra parte, en la Figura 32B, en el modo de ionización negativo, se observan 2 grupos principales, uno conformado por los individuos que pertenecen al grupo control y animales tratados con *H. sabdariffa* o *I. sonorae*, mientras que el segundo grupo está conformado por individuos que consumieron las diferentes decocciones herbales. Estos resultados indican que el perfil metabolómico del grupo de animales que consumieron la decocción de *I. sonorae* es el que más se compara con el grupo control. Por otro lado, se observan cambios metabólicos similares en todos los individuos de estudio, es decir, se observa la misma tendencia, ya sea una disminución o un aumento.

El análisis de componentes principales (PCA) es un método no supervisado que permite observar los principales componentes que explican la mayoría de la variación de datos y las similitudes o diferencias entre los grupos de estudio (Bevilacqua & Bro, 2020).



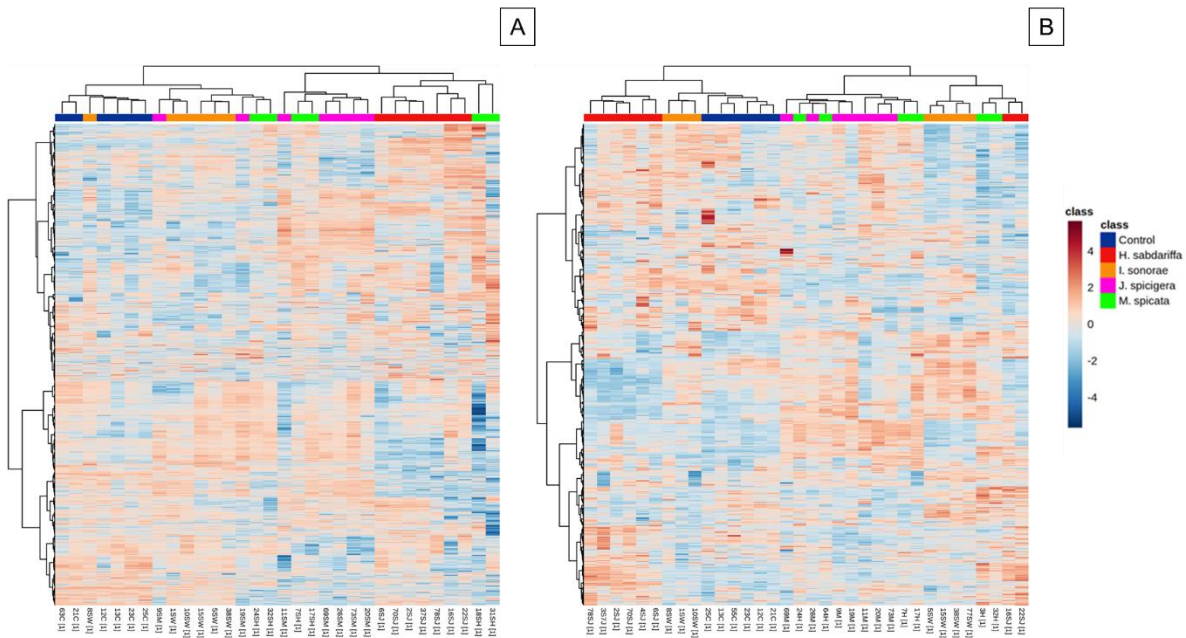


Figura 32. Mapa de calor de muestras individuales. Grupo control (Azul), grupo DC+*I. sonorae* (naranja), grupo DC+*J. spicigera* (rosa), grupo DC+*M. spicata* (verde), grupo DC+*H. sabdariffa* (rojo). A) modo positivo, B) modo negativo.

En las Figuras 33A y 33B se muestran los análisis multivariados de los grupos que consumieron dieta estándar y fueron tratados con las decocciones. En este modelo la varianza de los grupos es representada por PC1=17.2% y PC2=13.4%, para el modo positivo, mientras que, para el modo negativo, PC1=20.6% y PC2=16.7%. En la Figura 33A, modo positivo, se observa que el grupo tratado con *H. sabdariffa* es discriminado del grupo control, mientras que en la Figura 33B, modo negativo, se observa que el grupo tratado con *H. sabdariffa* se superpone con todos los grupos. Este comportamiento sugiere que dicha discriminación se debe principalmente a compuestos polifenólicos (antocianinas) presentes en la decocción. En la Figura 33B los grupos que consumieron las decocciones herbales de *I. sonorae* o *H. sabdariffa* están más cerca del grupo control. En nuestro estudio, dichas decocciones presentaron mayores efectos benéficos en los grupos alimentados con una dieta hipercalórica. Por otro lado, los grupos que consumieron *J. spicigera* o *M. spicata* se superponen y se encuentran alejados del grupo control.

Comparable con el análisis de PCA, el modelo de PLS-DA es un método supervisado que proporciona información sobre las muestras de cada grupo, por lo que es posible distinguir diferencias entre grupos y mejorar la validez y la capacidad analítica. Para la verificación del modelo se empleó una validación cruzada LOOCV y una prueba de permutación (100) con  $p > 0.01$ . Los datos obtenidos en el modo de ionización positivo mostraron un sobreajuste con  $p = 0.98$ , por lo que únicamente se presenta la gráfica de PLS-DA de los datos obtenidos en el modo de ionización negativa (Figura 34A). Los valores obtenidos en la validación para este modo de ionización fueron:  $R^2 = 0.98466$ ,  $Q^2 = 0.8208$  y  $p > 0.01$ . Las puntuaciones de los 2 componentes principales indicaron una varianza explicada del 19.4% (componente 1) y 14.9% (componente 2). Se observa que el grupo tratado con *H. sabdariffa* y el grupo control están superpuestos por lo que estos resultados sugieren que el consumo de esta decocción no altera el perfil metabólico. Por otro lado, los animales que consumieron las decocciones de *I. sonorae*, *J. spicigera* o *M. spicata* se encuentran alejados del grupo control.

Se obtuvieron los valores de puntuación (VIP) de los metabolitos responsables de los agrupamientos observados en la gráfica de PLS-DA (Figura 34B). Los valores de puntuación  $VIP > 2$  se consideraron como influyentes en el modelo de PLS-DA. Se obtuvieron 47 metabolitos en ionización negativa.

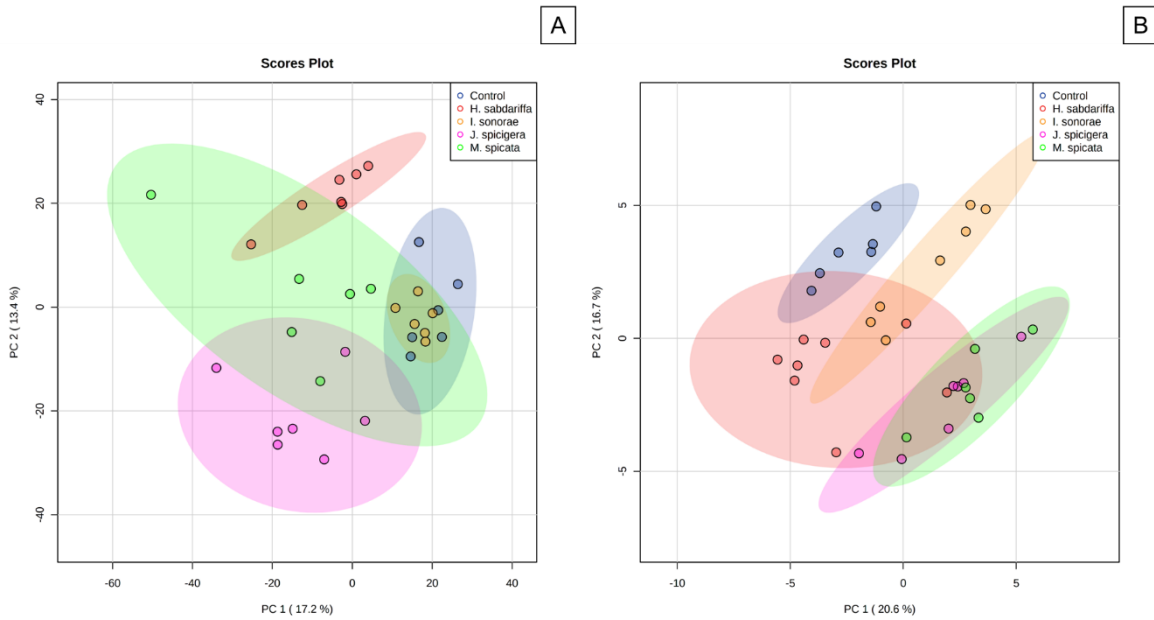


Figura 33. Análisis multivariado de discriminación de mínimos cuadrados parciales del grupo control (círculos azules), y grupos alimentados con dieta estándar y tratados con las decocciones de *I. sonorae* (círculos naranjas), *J. spicigera* (círculos rosas), *M. spicata* (círculos verdes) o *H. sabdariffa* (círculos rojos). A) Modo positivo, B) Modo negativo.

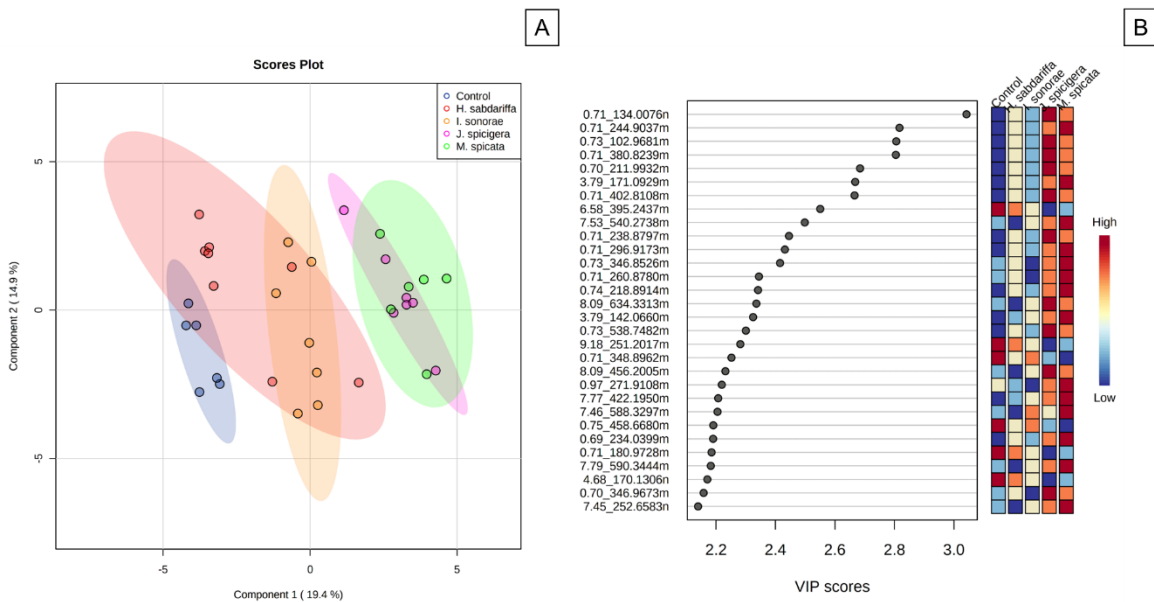


Figura 34. A) Análisis multivariado de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y B) Diagrama de puntuación VIP de los metabolitos hepáticos del grupo control (círculos azules), y grupos alimentados con dieta estándar y tratados con las decocciones de *I. sonorae* (círculos naranjas), *J. spicigera* (círculos rosas), *M. spicata* (círculos verdes) o *H. sabdariffa* (círculos rojos).

## 8. CONCLUSIONES

El tratamiento con la decocción de *H. sabdariffa* presentó una mejora en el control de peso corporal, así como una reducción en la disfunción de los adipocitos y una mayor sensibilidad a la respuesta de insulina. Sin embargo, estos efectos no están relacionados con el consumo de alimento, o con una inhibición de la lipasa pancreática. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la administración de la decocción de *H. sabdariffa* mejora la expresión de GLUT4 en los adipocitos, mejorando la captación de glucosa. Los efectos de esta planta podrían estar asociados con la presencia de compuestos derivados del ácido cafeoilquínico (CQA), como los ácidos 4-O-cafeoilquínico y clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico), los cuales mejoran la sensibilidad a la insulina estimulando la captación de glucosa a través de la activación de la vía AMPK-AS160-GLUT4. Además, se ha demostrado que la presencia de quercetina, otro compuesto encontrado en la decocción de esta planta mejora la sensibilidad a la insulina, incrementando la captación de glucosa en los tejidos periféricos.

La administración de las decocciones de *I. sonorae* mejoró los niveles de triglicéridos y glucosa en ratas obesas. Nuestros resultados sugieren que una mejora en la distribución y regulación de GLUT4 y una mejora en la respuesta a la insulina podría ser el mecanismo de acción por el cual *I. sonorae* tienen un efecto positivo a la salud. Los compuestos fitoquímicos de *I. sonorae* son poco conocidos, sin embargo, los ácidos salicílicos y 4-O-cafeoilquínico fueron los compuestos más abundantes, por lo que podrían asociarse a los efectos benéficos observados. Además, en el estudio metabolómico se observó un perfil similar a los animales tratados con *H. sabdariffa*, ya que dichos grupos fueron separados del grupo obeso, pero no entre sí. Estos resultados sugieren que los mecanismos de ambas plantas podrían ser similares.

Las decocciones de *I. sonorae* o *H. sabdariffa* podrían ayudar a controlar la glucosa en sangre después de la ingesta de alimentos con alto contenido de almidón, al mostrar un efecto inhibitorio de la  $\alpha$ -amilasa.

Las decocciones de *Justicia spicigera* o *Mentha spicata* no presentaron un efecto favorable sobre el control de peso corporal, resistencia a insulina o almacenamiento de lípidos en tejido hepático y adiposo en animales alimentados con una dieta hipercalórica. Estos resultados podrían estar relacionados con el modelo empleado y la forma de extracción. En nuestro estudio, las ratas obesas mostraron signos de resistencia a la insulina, mientras que la diabetes es una enfermedad establecida, con diferentes dianas alteradas. Además, se sabe que el solvente utilizado para las extracciones afecta el perfil y contenido de compuestos fenólicos. Por lo tanto, la decocción podría estar afectando la extracción de compuestos bioactivos.

Las histopatologías en el hígado de animales que consumieron decocciones herbales mostraron una arquitectura histológica normal, no se observaron daños tisulares o necrosis. Estos resultados fueron confirmados mediante la evaluación de parámetros relacionados con necrosis (AST, ALT, LDH) y colestasis (ALP, GGT, TBIL, DBIL) hepática. Sin embargo, se observó una alteración en la oxidación de proteínas en hígado en los animales que consumieron las decocciones de *J. spicigera*. Por otro lado, también se evaluaron parámetros bioquímicos relacionados con filtración glomerular y disfunción en la reabsorción tubular. La decocción de *H. sabdariffa* aumentó la creatinina en orina, lo cual posiblemente esté relacionado con deshidratación. La administración de *J. spicigera* aumentó los niveles de creatinina en suero. Los estudios metabolómicos revelaron un cambio en el perfil metabólico que fueron diferentes al grupo control.

Se requieren estudios adicionales, sobre todo que tomen en cuenta la heterogeneidad en las respuestas individuales, para demostrar la implicación del consumo de las decocciones herbales expuestas en este trabajo sobre los efectos benéficos y adversos. Además, la estandarización de extractos parece ser necesaria para generar mayor evidencia y permitir establecer recomendaciones sobre su uso y dosis efectivas, así como identificar a las moléculas activas y comprender su mecanismo de acción.

## 9. REFERENCIAS

- ADA. (2020). *Diagnosis* | ADA. American Diabetes Association. <https://www.diabetes.org/diabetes/a1c/diagnosis>
- Adeyemi, D. O., & Adewole, O. S. (2019). Hibiscus sabdariffa renews pancreatic  $\beta$ -cells in experimental type 1 diabetic model rats. *Morphologie*, 103(341), 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2019.04.003>
- Adisakwattana, S., Ruengsamran, T., Kampa, P., & Sompong, W. (2012). In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 110. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-110>
- Akdogan, M., Ozguner, M., Aydin, G., & Gokalp, O. (2004). Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiatae and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 23(1), 21-28. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht412oa>
- Akindahunsi, A. A., & Olaleye, M. T. (2003). Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 161-164. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00276-9)
- Alarcon-Aguilar, F. J., Calzada-Bermejo, F., Hernandez-Galicia, E., Ruiz-Angeles, C., & Roman-Ramos, R. (2005). Acute and chronic hypoglycemic effect of

Ibervillea sonorae root extracts-II. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 447-452. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.035>

Alarcon-Aguilar, F. J., Campos-Sepulveda, A. E., Xolalpa-Molina, S., Hernandez-Galicia, E., & Roman-Ramos, R. (2002). Hypoglycaemic activity of Ibervillea sonorae roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biology*, 40(8), 570-575. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.8.570.14652>

Alarcon-Aguilar, F. J., Zamilpa, A., Perez-Garcia, Ma. D., Almanza-Perez, J. C., Romero-Nuñez, E., Campos-Sepulveda, E. A., Vazquez-Carrillo, L. I., & Roman-Ramos, R. (2007). Effect of Hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(1), 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.020>

Alegbe, E. O., Terali, K., Olofinisan, K. A., Surgun, S., Ogbaga, C. C., & Ajiboye, T. O. (2019). Antidiabetic activity-guided isolation of gallic and protocatechuic acids from *Hibiscus sabdariffa* calyxes. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12927>

Amaya-Cruz, D., Pérez-Ramírez, I. F., Pérez-Jiménez, J., Nava, G. M., & Reynoso-Camacho, R. (2019). Comparison of the bioactive potential of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx and its by-product: Phenolic characterization by UPLC-QTOF MS and their anti-obesity effect in vivo. *Food Research International*, 126, 108589. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108589>

- Anaya-Esparza, L. M., Ramos-Aguirre, D., Zamora-Gasga, V. M., Yahia, E., & Montalvo-González, E. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Justicia spicigera* leaves. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 1093-1102. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0350-0>
- Apostolidis, E., Kwon, Y.-I., & Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>
- Ariza-Flores, R., Serrano-Altamirano, V., Navarro-Galindo, S., Ovando-Cruz, M. E., Vázquez-García, E., Barrios-Ayala, A., Michel-Aceves, A. C., Guzmán-Maldonado, S. H., & Otero-Sánchez, M. A. (2014). Variedades mexicanas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) 'alma blanca' y 'rosalíz' de color claro, y 'cotzaltzin' y 'tecoanapa' de color rojo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 181. <https://doi.org/10.35196/rfm.2014.2.181>
- Awad, N. E., Abdelkawy, M. A., Hamed, M. A., Souleman, A. M. A., & Ramadan, N. S. (2015). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Justicia spicigera* ethyl acetate fraction and characterization of its anthocyanin content. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(8), 6.
- Bacanli, M., Dilsiz, S. A., Başaran, N., & Başaran, A. A. (2019). Effects of phytochemicals against diabetes. En *Advances in Food and Nutrition*



*Research* (Vol. 89, pp. 209-238). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.006>

Bain, J. R., Stevens, R. D., Wenner, B. R., Ilkayeva, O., Muoio, D. M., & Newgard, C. B. (2009). Metabolomics Applied to Diabetes Research. *Diabetes*, *58*(11), 2429-2443. <https://doi.org/10.2337/db09-0580>

Baqueiro-Peña, I., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2014). Uses of *Justicia spicigera* in medicine and as a source of pigments. *Functional Foods in Health and Disease*, *4*(9), 401. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i9.150>

Barajas-Ramírez, J. A., Gutiérrez-Salomón, A. L., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2021). Concentration of roselle ( *Hibiscus sabdariffa* L) and sucrose in beverages: Effects on physicochemical characteristics and acceptance. *Food Science and Technology International*, *27*(6), 563-571. <https://doi.org/10.1177/1082013220973796>

Bayani, M., Ahmadi-hamedani, M., & Javan, A. J. (2017). Study of hypoglycemic, hypochilesterolemic and antioxidant activities of Iranian *Mentha spicata* leaves aqueous extract in diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *8*.

Ben Saad, A., Rjeibi, I., Alimi, H., Ncib, S., Bouhamda, T., & Zouari, N. (2018). Protective effects of *Mentha spicata* against nicotine-induced toxicity in liver and erythrocytes of Wistar rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *43*(1), 77-83. <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0144>

- Bergman, M., Manco, M., Sesti, G., Dankner, R., Pareek, M., Jagannathan, R., Chetrit, A., Abdul-Ghani, M., Buysschaert, M., Olsen, M. H., Nilsson, P. M., Medina, J. L., Roth, J., Groop, L., del Prato, S., Raz, I., & Ceriello, A. (2018). Petition to replace current OGTT criteria for diagnosing prediabetes with the 1-hour post-load plasma glucose  $\geq$  155 mg/dl (8.6 mmol/L). *Diabetes Research and Clinical Practice*, *146*, 18-33. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.09.017>
- Bevilacqua, M., & Bro, R. (2020). Can We Trust Score Plots? *Metabolites*, *10*(7), 278. <https://doi.org/10.3390/metabo10070278>
- 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. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>
- Calitz, C., Hamman, J. H., Fey, S. J., Wrzesinski, K., & Gouws, C. (2018). Recent advances in three-dimensional cell culturing to assess liver function and dysfunction: From a drug biotransformation and toxicity perspective. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *28*(5), 369-385. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1422580>
- Carvajal-Zarrabal, O., Hayward-Jones, P. M., Orta-Flores, Z., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D. M., Aguilar-Uscanga, M. G., & Pedroza-Hernández, M. F. (2009). Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. Dried Calyx Ethanol Extract on Fat Absorption-Excretion, and Body Weight Implication in Rats. *Journal of*

*Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1-5.

<https://doi.org/10.1155/2009/394592>

Cervantes-Villagrana, R. D., & Presno-Bernal, J. M. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(3), 98-106.

Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, 22.

<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>

Chen, Y., Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4), 357.

<https://doi.org/10.3390/metabo12040357>

CONABIO. (2020). *Plantas medicinales*. Biodiversidad Mexicana.

<https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>

Craig, E. A., Yan, Z., & Zhao, Q. J. (2015). The relationship between chemical-induced kidney weight increases and kidney histopathology in rats: Kidney weight and kidney histopathology. *Journal of Applied Toxicology*, 35(7), 729-736.

<https://doi.org/10.1002/jat.3036>

Culling, C. F. A. (1974). *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques: Including Museum Techniques*. Butterworth-Heinemann.

- Després, J.-P. (2012). Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease: An Update. *Circulation*, 126(10), 1301-1313. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067264>
- Díaz-Rivas, J. O., González-Laredo, R. F., Chávez-Simental, J. A., Montoya-Ayón, J. B., Moreno-Jiménez, M. R., Gallegos-Infante, J. A., & Rocha-Guzmán, N. E. (2018). Comprehensive Characterization of Extractable Phenolic Compounds by UPLC-PDA-ESI-QqQ of *Buddleja scordioides* Plants Elicited with Salicylic Acid. *Journal of Chemistry*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/4536970>
- Domínguez-Domínguez, S., Domínguez-López, A., & González-Huerta, A. (2007). Imbibition kinetics and moisture sorption isotherms of roselle seeds (*Hibiscus sabdariffa* L). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(3), 309-3016.
- Eid, H. M., & Haddad, P. S. (2017). The Antidiabetic Potential of Quercetin: Underlying Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, 24(4), 355-364.
- El-Saadany, S. S., Sitohy, M. Z., Labib, S. M., & El-Massry, R. A. (1991). Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Food / Nahrung*, 35(6), 567-576. <https://doi.org/10.1002/food.19910350603>
- ENSANUT. (2021). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 sobre Covid-19*. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2020/doctos/informes/ensanutCovid19ResultadosNacionales.pdf>

- Farid, O., Haidani, A. E., & Eddouks, M. (2018). Antidiabetic Effect of Spearmint in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18(6), 581-589. <https://doi.org/10.2174/1871530318666180517101708>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Fotakis, C., Tsigirmani, D., Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Strati, I. F., Makris, C., Tagkouli, D., Proestos, C., Sinanoglou, V. J., & Zoumpoulakis, P. (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*, 211, 963-971. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.124>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umapathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-Month*, 65(12), 100851. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.02.004>
- García-Compeán, D., Jáquez-Quintana, J. O., González-González, J. A., Lavallo-González, F. J., Villarreal-Pérez, J. Z., & Maldonado-Garza, H. J. (2013). La diabetes en la cirrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología*, 36(7), 473-482. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2013.01.012>
- García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of solvent-

temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 1-10.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1). <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>

Goetzman, E. S., Gong, Z., Schiff, M., Wang, Y., & Muzumdar, R. H. (2018). Metabolic pathways at the crossroads of diabetes and inborn errors. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(1), 5-17. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0091-x>

Hansawasdi, C., Kawabata, J., & Kasai, T. (2000). Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(5), 1041-1043. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1041>

Hawley, S. A., Fullerton, M. D., Ross, F. A., Schertzer, J. D., Chevtzoff, C., Walker, K. J., Peggie, M. W., Zibrova, D., Green, K. A., Mustard, K. J., Kemp, B. E., Sakamoto, K., Steinberg, G. R., & Hardie, D. G. (2012). The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. *Science*, 336(6083), 918-922. <https://doi.org/10.1126/science.1215327>

Hernández-Galicia, E., Calzada, F., Roman-Ramos, R., & Alarcón-Aguilar, F. (2007). Monoglycerides and Fatty acids from *Ibervillea sonorae* Root:

Isolation and Hypoglycemic Activity. *Planta Medica*, 73(3), 236-240.

<https://doi.org/10.1055/s-2007-967117>

Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N. P., Bunyapraphatsara, N., Sato, H., Herunsale, A., & Suthisisang, C. (2006). Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2), 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.033>

IDF. (2021). *IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition*. IDF Diabetes Atlas. <https://diabetesatlas.org/>

INEGI. (2022). *Sala de prensa*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=7104>

Ishtiaq, S., Akram, M., Kamran, S. H., Hanif, U., Afridi, M. S. K., Sajid-ur-Rehman, Afzal, A., Asif, A., Younus, M., & Akbar, S. (2017). Acute and sub-acute toxicity study of a Pakistani polyherbal formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 387. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1889-7>

Jamous, R. M., Abu-Zaitoun, S. Y., Akkawi, R. J., & Ali-Shtayeh, M. S. (2018). Antiobesity and Antioxidant Potentials of Selected Palestinian Medicinal Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2018/8426752>

Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E., & Martinez, A. (2006). Use of herbal

remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytotherapy Research*, 20(4), 250-255. <https://doi.org/10.1002/ptr.1820>

Kang, G. G., Francis, N., Hill, R., Waters, D., Blanchard, C., & Santhakumar, A. B. (2019). Dietary Polyphenols and Gene Expression in Molecular Pathways Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 140. <https://doi.org/10.3390/ijms21010140>

Kashani, K., Rosner, M. H., & Ostermann, M. (2020). Creatinine: From physiology to clinical application. *European Journal of Internal Medicine*, 72, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.10.025>

Lambert, J. D., Sang, S., & Yang, C. S. (2007). Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chemical Research in Toxicology*, 20(4), 583-585. <https://doi.org/10.1021/tx7000515>

Lee, J. (2013). Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes. *Archives of Pharmacal Research*, 36(2), 208-222. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0023-8>

Leitner, D. R., Frühbeck, G., Yumuk, V., Schindler, K., Micic, D., Woodward, E., & Toplak, H. (2017). Obesity and type 2 diabetes: Two diseases with a need for combined treatment strategies - EASO Can lead the way. *Obesity Facts*, 10(5), 483-492. <https://doi.org/10.1159/000480525>

Lenz, M., Hughes, H., Mitchell, J., Via, D., Guyton, J., Taylor, A., Gotto, A., & Smith, C. (1990). Lipid hydroperoxy and hydroxy derivatives in copper-catalyzed



oxidation of low-density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 31(6), 1043-1050. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42744-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42744-0)

Liu, Y., Wang, R., Zheng, K., Xin, Y., Jia, S., & Zhao, X. (2020). Metabonomics analysis of liver in rats administered with chronic low-dose acrylamide. *Xenobiotica*, 50(8), 894-905. <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1714791>

Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>

Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

Luyckx, V. A. (2012). Nephrotoxicity of alternative medicine practice. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 19(3), 129-141. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2012.04.005>

Martínez-Mora, J. A., Murillo-Villicaña, M., Salgado-Garciglia, R., Manzo-Avalos, S., Cortés-Rojo, C., Montoya-Pérez, R., & Saavedra-Molina, A. (2017). Relation of hypoglycemic activity and the antioxidant capacity of *Justicia spicigera* leaf extracts in diabetic rats. *The FASEB Journal*, 31(S1), 944.19-944.19. [https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1\\_supplement.944.19](https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.944.19)

- McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115(1), 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.093>
- McNiven, E. M. S., German, J. B., & Slupsky, C. M. (2011). Analytical metabolomics: Nutritional opportunities for personalized health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(11), 995-1002. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.05.016>
- Mehmood, A., Zhao, L., Wang, C., Nadeem, M., Raza, A., Ali, N., & Shah, A. A. (2019). Management of hyperuricemia through dietary polyphenols as a natural medicament: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1433-1455. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1412939>
- Morales-Luna, E., Pérez-Ramírez, I. F., Salgado, L. M., Castaño-Tostado, E., Gómez-Aldapa, C. A., & Reynoso-Camacho, R. (2019). The main beneficial effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on obesity is not only related to its anthocyanin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 596-605. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9220>
- Nafiu, A. O., Akomolafe, R. O., Alabi, Q. K., Idowu, C. O., & Odujoko, O. O. (2019). Effect of fatty acids from ethanol extract of *Moringa oleifera* seeds on kidney function impairment and oxidative stress induced by gentamicin in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109154. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109154>

- Nunes, D. R. da C. M. A., Monteiro, C. S. de J., & dos Santos, J. L. (2022). Herb-induced liver injury—A challenging diagnosis. *Healthcare*, *10*(2), 278. <https://doi.org/10.3390/healthcare10020278>
- Nwachukwu, D., Okwuosa, C., Nwachukwu, N., Ikekpeazu, E., Obika, L., & Eze, A. (2015). Assessment of hepatorenal indices in rats fed with aqueous extract of hibiscus sabdariffa. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*, *5*(3), 583. <https://doi.org/10.5455/jppa.20150319054434>
- Ojulari, O. V., Lee, S. G., & Nam, J.-O. (2019). Beneficial effects of natural bioactive compounds from Hibiscus sabdariffa L. on obesity. *Molecules*, *24*(1), 210. <https://doi.org/10.3390/molecules24010210>
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(6), 935-942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>
- Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V. E., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L. A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., & García-Carrancá, A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *143*(2), 455-462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.043>

- Pallares-Méndez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Cruz-Bautista, I., & del Bosque-Plata, L. (2016). Metabolomics in diabetes, a review. *Annals of Medicine*, *48*(1-2), 89-102. <https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1137630>
- Pannangpetch, P., Kongyingyoes, B., Kukongviriyapan, U., Yutanawiboonchai, W., Itharat, A., & Wisetmuen, E. (2013). Insulin secretion enhancing activity of roselle calyx extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*, *5*(2), 65. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.110520>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133-2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Pillai, S. S., & Mini, S. . (2016). Hibiscus rosa sinensis Linn. Petals modulate glycogen metabolism and glucose homeostasis signaling pathway in streptozotocin-induced experimental diabetes. *Plant Foods for Human Nutrition*, *71*(1), 42-48. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0521-6>
- Posadzki, P., Watson, L. K., & Ernst, E. (2013). Adverse effects of herbal medicines: An overview of systematic reviews. *Clinical Medicine*, *13*(1), 7-12. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.13-1-7>
- Prasomthong, J., Limpeanchob, N., Daodee, S., Chonpathompikunlert, P., & Tunsophon, S. (2022). Hibiscus sabdariffa extract improves hepatic steatosis, partially through IRS-1/Akt and Nrf2 signaling pathways in rats fed a high fat

diet. *Scientific Reports*, 12(1), 7022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11027-9>

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>

Rhee, E. P., Cheng, S., Larson, M. G., Walford, G. A., Lewis, G. D., McCabe, E., Yang, E., Farrell, L., Fox, C. S., O'Donnell, C. J., Carr, S. A., Vasan, R. S., Florez, J. C., Clish, C. B., Wang, T. J., & Gerszten, R. E. (2011). Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1402-1411. <https://doi.org/10.1172/JCI44442>

Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>

Ríos, E. A., Ruiz-Herrera, X., Tinoco-Pantoja, V., López-Barrera, F., Escalera, G. M., Clapp, C., & Macotela, Y. (2018). Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. *The FASEB Journal*, 32(6), 3457-3470. <https://doi.org/10.1096/fj.201701154R>

Rivera-Ramírez, F., Escalona-Cardoso, G. N., Garduño-Siciliano, L., Galaviz-Hernández, C., & Paniagua-Castro, N. (2011). Antiobesity and

hypoglycaemic effects of aqueous extract of *Ibervillea sonorae* in mice fed a high-fat diet with fructose. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2011/968984>

Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., & del Mar Contreras, M. (2019). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1212-1229. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399859>

SAGARPA. (2016). *Conoce más sobre la flor de jamaica*. gob.mx. <http://www.gob.mx/agricultura/articulos/conoce-mas-sobre-la-flor-de-jamaica>

Samuel, V. T., Beddow, S. A., Iwasaki, T., Zhang, X.-M., Chu, X., Still, C. D., Gerhard, G. S., & Shulman, G. I. (2009). Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29), 12121-12126. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812547106>

Sas, K. M., Karnovsky, A., Michailidis, G., & Pennathur, S. (2015). Metabolomics and diabetes: Analytical and computational approaches. *Diabetes*, 64(3), 718-732. <https://doi.org/10.2337/db14-0509>

Sellami, M., Louati, H., Kamoun, J., Kchaou, A., Damak, M., & Gargouri, Y. (2017). Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts of different spices and plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(3), 313-320. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1237479>

Semotiuk, A. J., Hernández-Romano, E. F., Colunga-GarcíaMarín, P., Salazar-Olivo, L. A., & Ezcurra, E. (2020). The mechanisms of the myth: *Ibervillea sonorae* inhibits  $\alpha$ -glucosidase and stimulates the secretion of insulin in vitro. *Journal of Herbal Medicine*, 23, 100354. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100354>

Sepúlveda-Jiménez, G., Reyna-Aquino, C., Chaires-Martínez, L., Bermúdez-Torres, K., & Rodríguez-Monroy, M. (2009). Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences*, 9(6), 629-632.

Shadhan, R., Bohari, S. M., Adam, Z., & Jamaluddin, H. (2019). Hibiscus sabdariffa Linn fruits methanolic extract and fractions mediated glucose uptake stimulation and glucose transporter 4 regulation. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 10(1), 25. [https://doi.org/10.4103/jpnr.JPNR\\_14\\_18](https://doi.org/10.4103/jpnr.JPNR_14_18)

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. En *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

Ünsal, C., Ünsal, H., Ekici, M., Koç Yildirim, E., Üner, A., Yıldız, M., Güleş, Ö., Ekren Aşıcı, G., Boyacıoğlu, M., Balkaya, M., & Belge, F. (2018). The effects of exhaustive swimming and probiotic administration in trained rats: Oxidative balance of selected organs, colon morphology, and contractility. *Physiology International*, 105(4), 309-324. <https://doi.org/10.1556/2060.105.2018.4.25>

Villalpando-Arteaga, E. V., Mendieta-Condado, E., Esquivel-Solís, H., Canales-Aguirre, A. A., Gálvez-Gastélum, F. J., Mateos-Díaz, J. C., Rodríguez-González, J. A., & Márquez-Aguirre, A. L. (2013). Hibiscus sabdariffa L. aqueous extract attenuates hepatic steatosis through down-regulation of PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c in diet-induced obese mice. *Food & Function*, 4(4), 618-626. <https://doi.org/10.1039/c3fo30270a>

WHO. (2019). *WHO global report on traditional and complementary medicine 2019*. World Health Organization; WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>

Wright, J. R., Colby, H. D., & Miles, P. R. (1981). Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 206(2), 296-304. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90095-3)

Wu, C., Zhang, X., Zhang, X., Luan, H., Sun, G., Sun, X., Wang, X., Guo, P., & Xu, X. (2014). The caffeoylquinic acid-rich Pandanus tectorius fruit extract increases insulin sensitivity and regulates hepatic glucose and lipid metabolism in diabetic db/db mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 412-419. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.12.002>

Wu, T., Qiao, S., Shi, C., Wang, S., & Ji, G. (2018). Metabolomics window into diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation*, 9(2), 244-255. <https://doi.org/10.1111/jdi.12723>



- Zapata-Bustos, R., Alonso-Castro, Á. J., Gómez-Sánchez, M., & Salazar-Olivo, L. A. (2014). *Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, *152*(3), 546-552. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.041>
- Zhang, X., Wu, C., Wu, H., Sheng, L., Su, Y., Zhang, X., Luan, H., Sun, G., Sun, X., Tian, Y., Ji, Y., Guo, P., & Xu, X. (2013). Anti-Hyperlipidemic Effects and Potential Mechanisms of Action of the Caffeoylquinic Acid-Rich *Pandanus tectorius* Fruit Extract in Hamsters Fed a High Fat-Diet. *PLoS ONE*, *8*(4), e61922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061922>
- Zhang, X., Yang, Z., Shi, Z., Zhu, Z., Li, C., Du, Z., Zhang, Y., Wang, Z., Jiao, Z., Tian, X., Zhang, J., Zhai, W., & Kan, Q. (2021). Analysis of bile acid profile in plasma to differentiate cholangiocarcinoma from benign biliary diseases and healthy controls. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *205*, 105775. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105775>
- Zielinski, A. A. F., Haminiuk, C. W. I., & Beta, T. (2019). Evaluation of the phenolics and in vitro antioxidant activity of different botanical herbals used for tea infusions in Brazil. *Current Nutrition & Food Science*, *15*(4), 345-352.