



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE FARMACIA



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

**Determinación del efecto antiobesidad e
insulino sensibilizador y su relación con los
parámetros bioquímicos e inflamatorios de la
mezcla crisina y naringenina en un modelo
murino de obesidad con dieta de cafetería**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA:

L.F. Hugo Ulises Ocampo Montalban

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio

Cuernavaca, Morelos 2019



FACULTAD DE FARMACIA
Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 10 de abril de 2019
Folio: FF/D/Sac/ CIP /MF/021/2019

**L.F. HUGO ULISES OCAMPO MONTALBAN
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis **"Determinación del efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería"**.

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Germán Bernal Fernández
Secretario: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Vocal 1: Dr. Julio César Almanza Pérez
Vocal 2: Dr. Cairo David Toledano Jaimes
Vocal 3: Dr. Rafael Villalobos Molina

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.
Jefatura de Posgrado



ccp: archivo: Dr. Germán Bernal Fernández, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Julio César Almanza Pérez, Dr. Cairo David Toledano Jaimes, Dr. Rafael Villalobos Molina

mitv

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

CONTENIDO

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUCCIÓN	7
4. ANTECEDENTES	7
4.1. Obesidad	8
4.2. Alteraciones bioquímicas en la obesidad	8
4.3. Clasificación del sobrepeso y obesidad	10
4.4. Prevalencia del sobrepeso y obesidad a nivel internacional y en México	12
4.5. Tratamiento del sobrepeso y obesidad	13
4.6. Obesidad e inflamación	14
4.6.1. Células inmunológicas que participan en la inflamación	15
4.6.2. Actividad de receptores de reconocimiento de patrones en la inflamación	15
4.7. Uso de productos naturales para el tratamiento del sobrepeso y obesidad	17
4.7.1. Flavonoides	17
4.7.2. Crisina	19
4.7.3. Naringenina	20
4.8. Modelos animales para inducir obesidad	20
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. HIPÓTESIS	24
7. OBJETIVO GENERAL	25

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
9. PROCEDIMIENTO	26
9.1. Uso y manejo de animales	26
9.2. Modelo murino de obesidad basado en una dieta de cafetería	26
9.3. Curvas de tolerancia a la glucosa	27
9.4. Tratamiento con la mezcla de crisina-naringenina (50:50)	27
9.5. Examen histológico	27
9.6. Peso relativo del hígado y del tejido adiposo	27
9.7. Determinación de los perfiles bioquímicos	28
9.8. Evaluación de la cantidad, pureza y calidad del ARN total	30
9.3. PCR-Tiempo real	31
9.4. Análisis de los datos	32
9.5. Análisis estadístico	32
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
10.1. Modelo murino de obesidad basado en una dieta de cafetería	32
10.2. Consumo en gramos y conteo calórico	34
10.3. Medidas somatométricas (IMC y circunferencia abdominal)	35
10.4. Hiperglucemia en ratas con dieta de cafetería	37
10.5. Monitoreo de peso con la mezcla crisina:naringenina	42
10.6. Consumo en gramos y conteo calórico durante el tratamiento	43
10.7. Medidas somatométricas durante el tratamiento	44
10.8. Efecto antihiper glucémico de la mezcla crisina:naringenina	46

10.9. Peso relativo del tejido adiposo e hígado después del tratamiento	
48	
10.10. Perfil bioquímico (glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL, VLDL Y LDL)	50
10.11. Insulinemia	51
10.12. Perfil hepático, transaminasas (ALT y AST)	52
10.13. Expresión de genes por PCR-Tiempo real	54
10.14. Histopatología	56
11. CONCLUSIÓN	57
12. PERSPECTIVAS	58
13. BIBLIOGRAFÍA	59

I. FIGURAS

Figura 1. La obesidad causa resistencia a la insulina y un estado de inflamación de bajo grado. Ambas contribuyen al desarrollo de varios trastornos metabólicos (adaptado de Jung & Choi, 2007).	8
Figura 2. Cambios bioquímicos ocasionados por la obesidad (adaptado de Sikaris, 2007).	9
Figura 3. Diacilglicerol y ceramidas como mediadores de la resistencia a la insulina por ácidos grasos. Ambos mecanismos inhiben la actividad de AKT, alterando la regulación de las vías metabólicas de la insulina (adaptado de Vázquez-Jiménez et al., 2017).	10
Figura 4. Índice previsto de obesidad (OECD, 2017).	12
Figura 5. Prevalencia del sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años de edad, en la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016.	13
Figura 6. Triada terapéutica para el tratamiento del sobrepeso y obesidad.	14
Figura 7. Exceso de nutrientes y la hipoxia de los adipocitos ocurre con el aumento de peso y la obesidad, desencadena la expresión de varios genes inflamatorios (adaptado de Jung & Choi, 2007).	17
Figura 8. Estructura química base de los flavonoides.	18
Figura 9. Estructura química de la crisina.	19
Figura 10. Estructura química de la naringenina.	20
Figura 11. Cortes histológicos del hígado, A grupo CE, B grupo CAF-Vh y C grupo CAF-Tx.	56

II. TABLAS

Tabla 1. Clasificación de sobrepeso y obesidad según el IMC (OMS, 2018; NOM-043)	11
Tabla 2. Clasificación de la circunferencia de cintura (IDF, 2006 y a la NOM-043).	11
Tabla 3. Fármacos utilizados para el tratamiento de la obesidad, México	14
Tabla 4. Estructura de flavonoides (Kumar & Pandey, 2013)	18
Tabla 5. Clasificación etiológica de los modelos de obesidad experimental (Carmona, 2010).	21
Tabla 6. Productos ofrecidos durante la dieta de cafetería	26

III. GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto del consumo crónico de la dieta estándar (CE) y dieta de cafetería (CAF), sobre el peso de ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 vs. CE	33
---	----

- Gráfica 2.** Delta de peso (*peso final – peso inicial*) del grupo CE y CAF, sobre el peso de ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; ** p < 0.01 vs. CE 34
- Gráfica 3.** Gramos consumidos del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 vs. CE. 34
- Gráfica 4.** Calorías consumidas del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 vs. CE. 35
- Gráfica 5.** Índice de masa corporal (IMC) del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; ** p < 0.01 vs. CE. 36
- Gráfica 6.** Circunferencia abdominal del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 vs. CE. 37
- Gráfica 7.** Glucemia en ayunas del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 ** p < 0.01 vs. CE 38
- Gráfica 8.** Curva de tolerancia a la glucosa a la cuarta semana del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 vs. CE. ABC para el grupo CE 519.5 y CAF 550.8 38
- Gráfica 9.** Curva de tolerancia a la glucosa a la octava semana del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; ** p < 0.01 vs. CE. ABC para el grupo CE 450.6 y CAF 472.2 39
- Gráfica 10.** Curva de tolerancia a la glucosa a la semana dieciséis del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 vs. CE. ABC para el grupo CE 456.2 y CAF 503.2 39
- Gráfica 11.** Curva de tolerancia a la glucosa a la semana dieciocho del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 14; * p < 0.05 vs. CE. ABC para el grupo CE 456.3 y CAF 513.6 40
- Gráfica 12.** Efecto del consumo crónico del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho de la cepa tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 ** p < 0.01 vs. CE. 42
- Gráfica 13.** Delta de peso (*peso final día 20 – peso inicial día 0*) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 vs. CE. 43
- Gráfica 14.** Gramos consumidos del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 vs. CE. 44
- Gráfica 15.** Calorías consumidas del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 vs. CE. 44
- Gráfica 16.** IMC del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; *** p < 0.001 Vs CE; $\phi\phi\phi$ p < 0.001 vs. CAF-Vh. 45

Gráfica 17. Circunferencia abdominal del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 vs. CE. 46

Gráfica 18. Glucemia en ayunas del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 vs. CE; ϕ p < 0.05 vs. CAF-Vh. 47

Gráfica 19. Curva de tolerancia a la glucosa del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; ** p < 0.01 *** p < 0.001 vs. CE. ABC para el grupo CE 456.3, CAF-Vh 445.0 y CAF-Tx 436.6 48

Gráfica 20. Peso relativo de TA (tejido adiposo) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; *** p < 0.001 vs. CE. 49

Gráfica 21. Peso relativo del hígado del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * p < 0.05 Vs CE; ϕ p < 0.05 vs. CAF-Vh. 50

Gráfica 22. Perfiles bioquímicos: glucosa (Glu), triglicéridos (Tg), colesterol (Col), lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; *** p < 0.001 Vs CE $\phi\phi$ p < 0.001 vs. CAF-Vh. 51

Gráfica 23. Niveles de insulina del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 5 y n = 4; *** p < 0.001 Vs CE ϕ p < 0.01 vs. CAF-Vh. 52

Gráfica 24. Perfiles hepáticos: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; ** p < 0.01 *** p < 0.001 vs. CE. 54

Gráfica 25. Análisis de RT-PCR de expresiones de PPAR- γ en tejido adiposo del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * P < 0.05 Vs CE ϕ p < 0.01 vs. CAF-Vh. 55

Gráfica 26. Análisis de RT-PCR de expresiones de PPAR- α en tejido adiposo del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * P < 0.05 vs. CE. 55

Gráfica 27. Análisis de RT-PCR de expresiones de TNF- α en tejido adiposo del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * P < 0.05 vs. CE. 56

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ALT	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
CAF	Grupo dieta de cafetería
CAF-Tx	Grupo dieta de cafetería tratado con la mezcla crisina y naringenina
CAF-Vh	Grupo dieta de cafetería vehículo (Tween 80 al 10%)
Cal	Caloría
CE	Grupo dieta estándar
cm	Centímetro
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
dL	Decilitro
ENSANUT MC	Encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino
g	Gramo
Glu	Glucosa
h	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IDF	Federación internacional de diabetes
IMC	Índice de masa corporal
kg	Kilogramo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
m	Metro
mg	Miligramo
NOM	Norma mexicana
OECD	Organización para la cooperación y el desarrollo económicos
OMS	Organización mundial de la salud
TA	Tejido adiposo
Tg	Triglicéridos
v. gr.	<i>verbi gratia</i> “por ejemplo”
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

1. RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial en la que están involucradas aspectos genéticos, ambientales y cambios en los estilos de vida (aumento excesivo de nutrientes y falta de actividad física), que condicionan una acumulación excesiva de tejido adiposo. La obesidad es el principal factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas como: diabetes mellitus, hipertensión, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, hígado graso no alcohólico y algunos tipos de cáncer.

En este contexto, actualmente se están buscando nuevas alternativas terapéuticas a partir de productos naturales, que garanticen su eficacia y su seguridad, con el fin de prevenir o demorar las complicaciones que genera la obesidad. En el presente trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar para obtener el modelo de obesidad con dieta de cafetería, los cuales fueron divididos en dos grupos y fueron sometidos a una dieta específica por 135 días; grupo CE (grupo alimentado con dieta estándar) y el grupo CAF (grupo alimentado con dieta hipercalórica: “dieta de cafetería”), así mismo, durante el periodo de experimentación se evaluaron los parámetros somatométricos (peso, circunferencia abdominal e IMC), monitoreo glucémico (glucemia en ayunas y CTG: “curva de tolerancia a la glucosa”), mostrando cambios significativos con respecto al grupo CE, además de cuantificar gramos y calorías consumidas durante el proceso. Una vez obtenido el modelo de obesidad con dieta de cafetería, se decidió evaluar la mezcla de crisina y naringenina (50:50) en un periodo de 20 días. La administración permitió establecer el efecto antiobesidad, insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios, al mostrar cambios significativos en los esos parámetros.

En conclusión, la dieta de cafetería mostró ser un modelo óptimo para la generación de obesidad en rata, ya que se ven alterados los parámetros somatométricos y bioquímicos, que podría ser utilizado como modelo para la evaluación de nuevas biomoléculas con potencial efecto antiobesidad y enfermedades concomitantes. La mezcla crisina y naringenina en animales sometidos a la dieta de cafetería, produjo cambios significativos en el metabolismo de lípidos, al disminuir Tg, VLDL y LDL, y su acumulación en TA y en hígado; también hubo cambios en el monitoreo glucémico y en insulinemia, lo que la condiciona como potencial candidato para su investigación en distintos ensayos que sustenten su eficacia en la actividad antiobesidad, en sus alteraciones bioquímicas e inflamatorias.

2. ABSTRACT

Obesity is a chronic, complex and multifactorial disease involving genetic, environmental and lifestyle changes (excessive increase in nutrients and lack of physical activity), which lead an excessive accumulation of adipose tissue. Obesity is the main risk factor for developing chronic diseases such as: diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemias, cardiovascular diseases, non-alcoholic fatty liver and some types of cancer.

Therefore, new therapeutic alternatives are being sought based on natural products, which guarantee their efficacy and safety, in order to prevent or delay the complications generated by obesity. In current work, male rats of the Wistar strain were used to obtain the obesity model with a cafeteria diet, which were divided into two groups and subjected to a specific diet for 135 days; CE group (group fed with standard diet) and CAF group (group fed with hypercaloric diet: "cafeteria diet"), as well as somatometric parameters (weight, abdominal circumference and BMI), glycemic monitoring (fasting blood glucose and OGTT "oral glucose tolerance test") were recorded during experimental period, showing significant changes with respect to CE group, in addition to counting grams and calories consumed during the process . Once the cafeteria diet obesity model was obtained, it was decided to evaluate the mixture of chrysin and naringenin (50:50) in a period of 20 days. The mixture administration allowed to identify the anti-obesity effect, insulin sensitizer and its relationship with biochemical and inflammatory parameters, by showing significant changes in those parameters.

In conclusion, the cafeteria diet showed to be an optimal model for the generation of obesity in rats, since the somatometric parameters are altered and could be used for the evaluation of new biomolecules with potential antiobesity effect and their concomitants. As for the treatment with the mixture of chrysin and naringenin, it produced significant changes in the metabolism of lipids, diminished Tg, VLDL and LDL, as well as its accumulation in adipose tissue and in liver; also it was observed changes in the glycemic monitoring and in insulinemia. Results suggest that the mixture of chrysin:naringenin (50:50) could be used for development of potential antiobesity drug and related diseases, this because its effectiveness in anti-obesity activity, biochemical and inflammatory alterations.

3. INTRODUCCIÓN

México se ha declarado en emergencia sanitaria por la epidemia de obesidad y diabetes. En 2016, 72.5% de los adultos tuvieron sobrepeso y obesidad, la cual ha sido mayor entre las mujeres en edad reproductiva y los residentes de zonas rurales (ENSANUT MC 2016). La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial en la que están involucrados aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida, que condicionan una acumulación excesiva de grasa corporal. Los principales factores de riesgo identificados son: la falta de actividad física, el sedentarismo, la ingesta de alimentos con alta densidad energética y en grandes porciones, el consumo de refrescos y bebidas azucaradas, y una frecuente ingesta de alimentos entre comidas. Así mismo, esta representa altos costos médicos, en 2014 se estimaron \$151,894 millones de pesos, la cual equivale al 34% del gasto público de salud y causa una pérdida de productividad estimada en \$71,669 millones de pesos (0.4% del PIB) por año (Rivera-Dommarco *et al.*, 2018).

Aunque se han desarrollado una variedad de terapias, estos tratamientos a menudo presentan efectos secundarios adversos o una limitada eficacia. Por lo tanto, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para prevenir o tratar la obesidad y sus concomitantes (Cui & Chen, 2017).

El presente trabajo tiene como objetivo, estudiar el efecto antiobesidad de la mezcla crisina y naringenina 50:50 en un modelo de obesidad (en ratas macho de la cepa Wistar), alimentadas con dieta de cafetería (una dieta con alto contenido calórico, que asemeja al consumo actual de la población occidental). Con relación a crisina y naringenina, existen diversidad de estudios previos que relacionan a ambas moléculas con efectos farmacológicos dirigidos a tratar la obesidad, la diabetes, la hipertensión y enfermedades concomitantes (Torres-Piedra *et al.*, 2010; Pushpavalli *et al.*, 2010; Veerappan *et al.*, 2014; Karima *et al.*, 2018), y como ejemplo podemos mencionar los estudios realizados por Ramírez-Espinosa *et al.*, 2017 (crisina 50 mg/kg) y Ortiz-Andrade *et al.*, 2008 (50 mg/kg) demostrando efectos antihiper glucémico y antidiabético en modelos experimentales. Sin embargo, no se han realizado estudios conducentes a estudiar la eficacia de la mezcla crisina y naringenina en modelos experimentales de dieta de cafetería y que involucre alteraciones metabólicas, cardiovasculares e inflamatorias, entre otras, que permita proponer dicha mezcla como un nuevo tratamiento integral para la obesidad y sus concomitantes.

4. ANTECEDENTES

4.1. Obesidad

La obesidad es una condición común pero a menudo subestimada de importancia clínica y de salud pública en muchos países del mundo, la cual ha alcanzado dimensiones epidémicas en el mundo occidental actual, sin embargo, el fenómeno es conocido desde la antigüedad. Los antiguos griegos fueron los primeros en reconocer la obesidad como un trastorno metabólico, Hipócrates (456 - 375 a.C.) declaró que *"la muerte súbita es más frecuente en aquellos individuos que son naturalmente gordos, que en las personas delgadas"*. En la época actual (1975 al 2016), la prevalencia mundial de la obesidad se ha triplicado, según datos de la organización mundial de la salud (OMS) y la ha descrito como un riesgo epidemiológico en el mundo. Desde entonces la incidencia ha aumentado constantemente, convirtiéndose en un problema de salud pública. La adopción de los estilos de vida occidentales, que incluye cambios drásticos en el consumo excesivo de los alimentos y la falta de actividad física han contribuido al incremento de la prevalencia de factores de riesgos cardiometabólico (figura 1), favoreciendo un incremento rápido en las enfermedades crónicas asociadas a la obesidad (OMS, 2018; NOM-008-SSA3-2010; Apostolopoulos *et al.*, 2016; Jung & Choi, 2007).

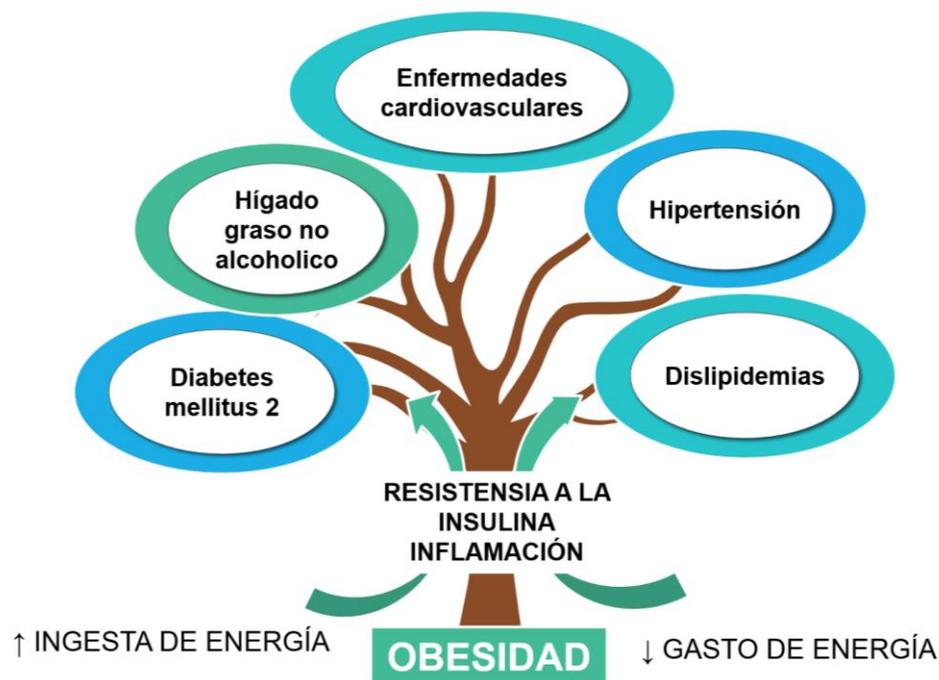


Figura 1. La obesidad causa resistencia a la insulina y un estado de inflamación de bajo grado. Ambas contribuyen al desarrollo de varios trastornos metabólicos (adaptado de Jung & Choi, 2007).

4.2. Alteraciones bioquímicas en la obesidad

En personas sanas, el tejido adiposo representa el 20% de la masa corporal en los hombres y el 30% en las mujeres, por el contrario, en personas con obesidad mórbida se expande enormemente hasta 50% de la masa corporal. La dislipidemia está vinculada con la obesidad, se caracteriza por hipertrigliceridemia, que predispone al hígado graso (actividad sérica elevada de ALT, alanina aminotransferasa) y ácidos grasos libres en plasma, niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de composición anormal de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (figura 2); el factor que contribuye más a la dislipidemia en la obesidad es la liberación incontrolada de ácidos grasos del tejido adiposo, especialmente el tejido adiposo visceral, a través de la lipólisis, lo que aumenta el suministro de ácidos grasos al hígado y la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Por otra parte, la obesidad se asocia con la insulina, ya que el tejido adiposo es uno de los tejidos sensibles a la insulina y esta estimula el almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo e incluye la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, aumenta la captación de glucosa y de ácidos grasos derivados de lipoproteínas circulantes, aumenta la lipogénesis e inhibe la lipólisis; sin embargo, la resistencia se asocia con muchas anomalías (Sikaris, 2007; Jung & Choi, 2007).



Figura 2. Cambios bioquímicos ocasionados por la obesidad (adaptado de Sikaris, 2007).

El exceso de lípidos de la dieta o de la obesidad está asociada con aumento en la liberación de ácidos grasos libres y de triglicéridos en torrente sanguíneo, que excede la capacidad de almacenamiento y de oxidación, provocando que los ácidos grasos y otros (ácido linoleico, diacilglicerol, ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico y ceramidas) actúen como inductores de resistencia a la insulina (figura 3). Los triglicéridos almacenados en los

adipocitos son metabolizados (lipólisis) para liberar ácidos grasos libres en circulación y que sean transportados a otros tejidos para ser utilizados como fuente de energía. Los ácidos grasos libres circulantes en exceso pueden acumularse ectópicamente en tejidos sensibles a la insulina (hígado, músculo esquelético, corazón y células β pancreáticas) y afectar la acción antilipolítica de la insulina, aumentando la liberación de ácidos grasos en la circulación (Morigny *et al.*, 2016; Vázquez-Jiménez *et al.*, 2017).

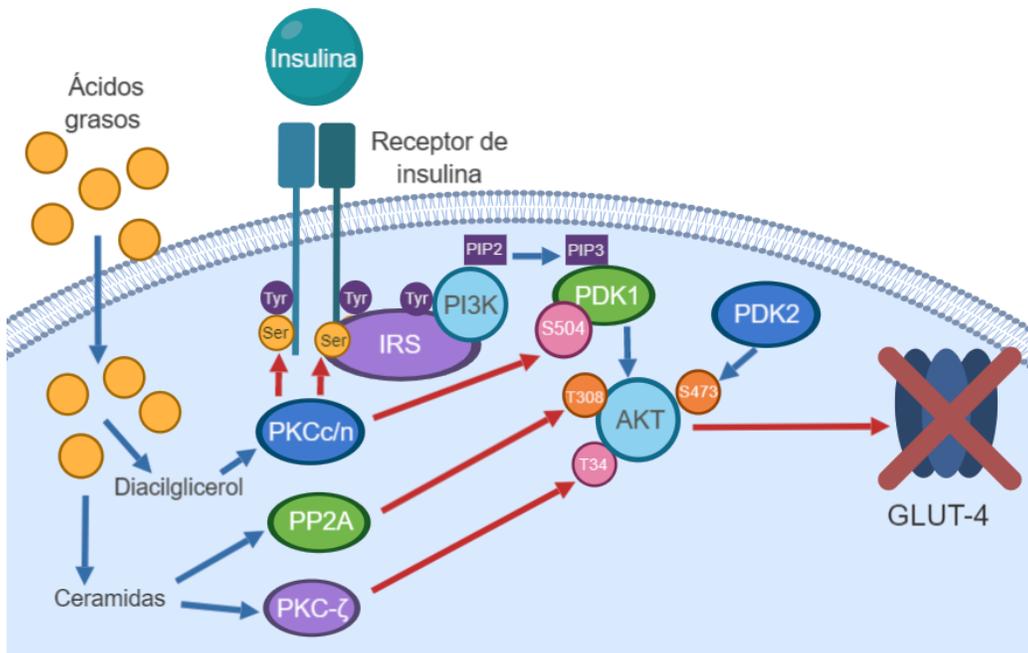


Figura 3. Diacilglicerol y ceramidas como mediadores de la resistencia a la insulina por ácidos grasos. Ambos mecanismos inhiben la actividad de AKT, alterando la regulación de las vías metabólicas de la insulina (adaptado de Vázquez-Jiménez *et al.*, 2017).

4.3. Clasificación del sobrepeso y obesidad

Existen técnicas que permiten clasificar el grado de obesidad y el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, a estas técnicas se les conoce como medidas antropométricas.

La técnica más utilizada y simple es el índice de masa corporal (IMC) común tanto en hombres como en mujeres, esta se obtiene del peso de una persona en kilogramos (kg) dividido por el cuadrado de la talla en metros (m^2). Una persona con un $IMC \geq 25$ es considerada con sobrepeso y obesa con un $IMC \geq 30$ (tabla 1); sin embargo, el IMC no es un buen indicador viable, particularmente en personas mayores y jóvenes, ya que esta medida no refleja la grasa intraabdominal (visceral), la cual está relacionada con el

síndrome metabólico y riesgos cardiovasculares. Sin embargo, la medición antropométrica utilizada para la estimación de la grasa intraabdominal es la circunferencia de la cintura (CC), la federación internacional de la diabetes (IDF) ha propuesto un umbral para considerar que el paciente se encuentra en riesgo (tabla 2) (OMS, 2016; Mohamed *et al.*, 2014; IDF, 2006; NOM-043-SSA2-2005).

Tabla 1. Clasificación de sobrepeso y obesidad según el IMC (OMS, 2018; NOM-043).

Clasificación por IMC de acuerdo con la OMS y la NOM-043						
Fuente	Bajo peso	Normal	Sobrepeso	Obesidad		
				Grado I	Grado II	Grado III
OMS	< 18.5	18.5 - 24.9	25 - 29.9	≥ 30 - 34.9	≥ 35 - 39.9	≥ 40
NOM-043	-	-	25 - 29.9	≥ 30		
			≥ 23 - < 25*	≥ 25*		

*Baja talla = estatura menor a 1.50 metros en las mujeres adultas y menor de 1.60 metros para el hombre adulto.

Tabla 2. Clasificación de la circunferencia de cintura (IDF, 2006 y a la NOM-043).

Circunferencia de cintura de acuerdo con los criterios de la IDF y la NOM-043		
Genero	IDF*	NOM-043
Hombre	≥ 95 cm	> 102 cm
Mujer	≥ 80 cm	> 88 cm

*CC para grupos étnicos de Centroamérica y Sur

Otro método muy utilizado para la clasificación de la obesidad y su distribución de grasa es (Aburto-López *et al.*, 2018):

- Obesidad androide: Conocida como obesidad abdominal, la cual se presenta en su mayoría en varones. La cual se caracteriza por el acúmulo de grasa por encima de la cintura. Se trata de un factor que predispone para enfermedades como: hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, colelitiasis, hiperinsulinismo y diabetes mellitus.
- Obesidad ginecoide: Presenta mayor frecuencia en mujeres que en varones. Se caracteriza por la acumulación de grasa en bajo vientre, caderas y músculo.
- Obesidad de distribución homogénea: Aquella en la que el exceso de grasa no predomina en ninguna zona del cuerpo.

4.4. Prevalencia del sobrepeso y obesidad a nivel internacional y en México

De acuerdo con la actualización de la Obesity Update (Obesity Update, 2017), lanzada por la organización para la cooperación y el desarrollo económicos (Organization for Economic Cooperation and Development, OCDE por sus siglas en inglés), muestra un aumento constante en el índice de obesidad hasta el 2030 (figura 4). Los niveles de obesidad son particularmente altas en los Estados Unidos (47%), México (39%) e Inglaterra (35%), y se prevé que sean más obesos en el 2030. Por el contrario, se espera que el aumento sea más débil en Italia (13%) y Corea (9%).

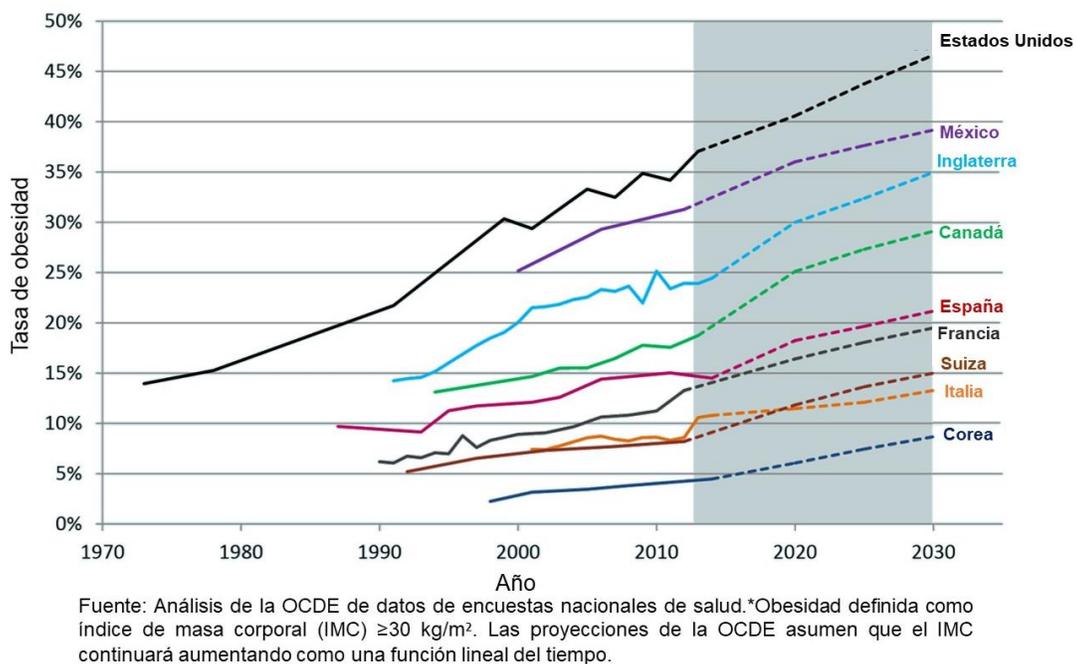
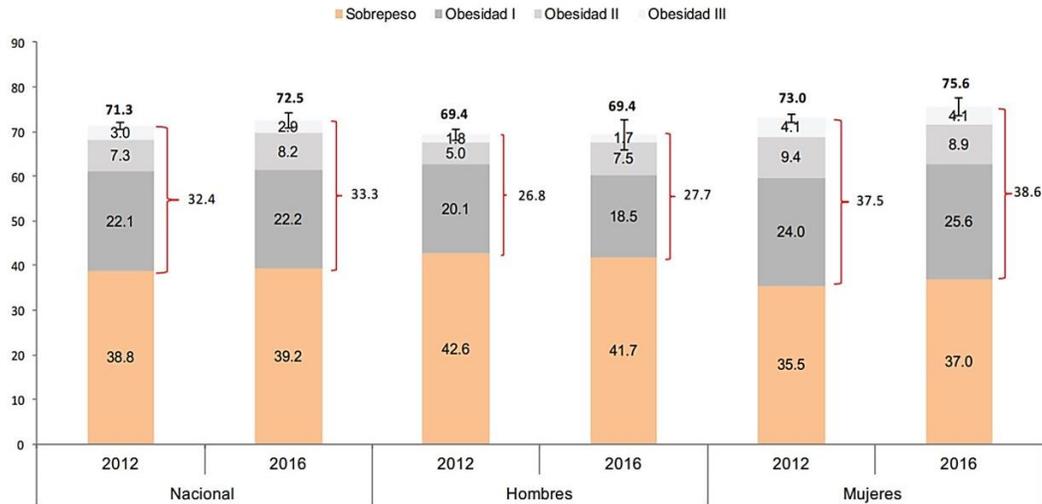


Figura 4. Índice previsto de obesidad (OECD, 2017).

Por su parte, la encuesta nacional de salud y nutrición de medio camino (ENSANUT MC 2016), muestra aumento en la prevalencia del sobrepeso y obesidad en niños, adolescentes y adultos. En la población adulta mayor de 20 años de edad, la prevalencia combinada de sobrepeso y la obesidad pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016, este aumento es de 1.3% sin diferencia significativa. Al categorizar por sexo en la ENSANUT MC 2016, se observa que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en mujeres adultas es de 75.6% y en hombres la prevalencia combinada es 69.4% en 2016, lo que sugiere que la población femenina tiene mayor posibilidad de sufrir enfermedades asociadas al sobrepeso y obesidad (figura 5).



Fuente: ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016. *Clasificación de IMC descrita por la OMS: sobrepeso = 25.0-29.9 kg/m², obesidad grado I = 30.0-34.9 kg/m², obesidad grado II = 35.0-39.9 kg/m², obesidad grado III ≥ 40.0 kg/m².

Figura 5. Prevalencia del sobrepeso y obesidad en población de 20 o más años de edad, en la ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016.

4.5. Tratamiento del sobrepeso y obesidad

La norma oficial mexicana NOM-008-SSA3-2010, para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad, establece que las medidas terapéuticas para el sobrepeso y obesidad, deben incluir un tratamiento integral, por un médico, nutriólogo, psicólogo, régimen de actividad física y, si se requiere, tratamiento farmacológico o quirúrgico, orientado a lograr cambios en el estilo de vida, y a disminuir o erradicar los riesgos para la salud y mejorando la calidad de vida del paciente. Cuando exista falta de respuesta al tratamiento dietoterapéutico (actividad física, ejercicio y dieta) en un periodo de, al menos, tres meses en pacientes con IMC de ≥ 30 kg/m² o más, se deberá prescribir tratamiento farmacológico.

En la actualidad el tratamiento farmacológico de la obesidad se puede clasificar en tres grupos, basados en diferentes mecanismos de acción (Li *et al.*, 2009):

- Fármacos que reducen la ingesta de alimentos (*v. gr.* Fentermina y sibutramina).
- Fármacos que interfieren con la absorción de grasa (*v. gr.* Orlistat).
- Otros fármacos que no fueron diseñados para la obesidad, pero han mostrado reducción de peso (*v. gr.* Metformina).

El tratamiento actual y emergente para el control de la obesidad en México se describe en la tabla 3, de acuerdo con la guía de práctica clínica prevención, diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y la obesidad exógena.

Tabla 3. Fármacos utilizados para el tratamiento de la obesidad, México.

FÁRMACO	MODO DE ACCIÓN	DOSIS	EFECTO ADVERSO
Orlistat	Inhibidor de la lipasa pancreática	120 mg antes de cada comida	Heces blandas y escurrimiento anal. Reduce absorción de vitaminas liposolubles
Metformina	Antihiperglucemiante	425 a 500 mg c/12 h durante 6 meses	Diarrea, náuseas, vómito, flatulencia. Tiene el menor índice de acidosis láctica

Un estudio clínico realizado por XENDOS (Torgerson *et al.*, 2004) mostró que el tratamiento con orlistat (120 mg tres veces al día durante 4 años) redujo la incidencia de diabetes tipo 2 del 37% respecto al placebo, consiguiendo una disminución del peso (5.8 kg). Otro estudio realizado por DPP (Knowler *et al.*, 2002) con un grupo tratado con metformina (al mes, la dosis incrementó a 850 mg dos veces al día durante 2.8 años) muestra leve descenso del peso (2.1 kg), con reducción de incidencia de diabetes tipo 2 del 31%, inferior al resultado obtenido con el grupo que modificó su estilo de vida (58 %).

Se ha preferido utilizar una triada de hábitos para la reducción del sobrepeso y obesidad. El tratamiento dietético y la actividad física son de elección como coadyuvante del tratamiento farmacológico, con el objetivo de incrementar la pérdida de peso en el paciente con obesidad mórbida (figura 6).



Figura 6. Triada terapéutica para el tratamiento del sobrepeso y obesidad.

4.6. Obesidad e inflamación

Se ha observado que los obesos presentan un proceso inflamatorio sistémico crónico de bajo grado. Esta inflamación difiere de la inflamación aguda/clásica por la ausencia de los signos típicos de la inflamación (aumento de temperatura, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de la función), pero hay liberación de citocinas inflamatorias e infiltración de células inmunológicas en el tejido (León-Pedroza *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016).

El tejido adiposo (TA) está formado principalmente por adipocitos (lipocitos), pero también por tejido conectivo, tejido nervioso y células inmunológicas. Es dividido en dos tipos, en tejido blanco que almacena lípidos para ser liberados en periodos de ayuno y la secreción adipocitoquinas (adipocinas) y el tejido marrón que tiene un gran citoplasma, las mitocondrias son abundantes y los adipocitos marrones son utilizados para generar calor. Estos adipocitos metabolizan glucosa y lípidos para mantener la homeostasis (Apostolopoulos *et al.*, 2016).

Los macrófagos y los adipocitos son células implicadas en la inflamación, ya que producen un gran número de moléculas llamadas adipocitoquinas. Dentro del grupo de las adipocitoquinas existe dos tipos: pro-inflamatorias y antiinflamatorias. Las principales citocinas pro-inflamatorias liberadas por los adipocitos son: interleucina (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-33, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), interferón delta (INF- δ), por otra parte las citocinas antiinflamatorias liberadas por los adipocitos son: factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), IL-4, IL-10, IL-13, antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra) (Apostolopoulos *et al.*, 2016; Mraz & Haluzik, 2014; Castro *et al.*, 2016).

4.6.1. Células inmunológicas que participan en la inflamación

El proceso inflamatorio en la obesidad es ocasionado por infiltración de células de origen mieloides y linfoides. Las células mieloides son las que participan en la respuesta inmunológica innata, como los macrófagos, su participación es abundante en TA y por mucho tiempo se consideró como la única inmunidad implicada en la obesidad-inflamación. Por otra parte, las células linfoides de la respuesta adaptativa también participan, como los linfocitos T, son el segundo tipo de células que participan en la obesidad-inflamación (Mraz & Haluzik, 2014).

4.6.2. Actividad de receptores de reconocimiento de patrones en la inflamación

El sistema inmune está compuesto por receptores especializados en la detección de patógenos/daño a tejidos, que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los PRR reconocen dos tipos de moléculas, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que reconocen moléculas derivadas de patógenos y los patrones asociados a daño (DAMP) que son liberados por tejidos que han sufrido daño. Dentro del grupo se encuentra los receptores tipo toll (TLR) expresado en macrófagos y células dendríticas, aunque también se encuentran en células que responden a la insulina, como los adipocitos, hepatocitos y miocitos. Al unirse a su ligando los TLR desencadenan una cascada de señalización que activa la respuesta inflamatoria, tales como TNF- α y MCP-1 en adipocitos. Los TLR1, TLR2, TLR6 están relacionados con la obesidad-inflamación, se sabe que los ácidos grasos saturados son sustancias proinflamatorias que activan a los TLR y/o los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (León-Pedroza *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2013; Olefsky & Glass, 2010).

4.6.3. Macrófagos (M1/M2)

Cuando los macrófagos son inducidos por diferentes mediadores experimentan una diferenciación fenotípica. En los llamados M1 o “macrófagos activados clásicamente”, su diferenciación se debe a la exposición por interferón gamma (IFN- γ) y de los ligandos de TLR. M1 secreta citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α , MCP-1 y algunas especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, los llamados M2 o “macrófagos activados alternativamente”, su diferenciación se debe a la exposición por IL-4, IL-10, IL-13 que activan arginasa 1 (Arg 1), bloqueando la actividad de iNOS. M2 secreta citocinas antiinflamatorias como el antagonista del receptor IL-1, IL-4, IL-10, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que revierten la respuesta inflamatoria (Apostolopoulos *et al.*, 2016; Esse *et al.*, 2014). La infiltración de macrófagos es ocasionada por el aumento del TA, los adipocitos experimentan hiperplasia e hipertrofia (ocasionado por el aumento de alimentos y falta de actividad física), disminuyendo el riesgo sanguíneo, provocando hipoxia (figura 7). El tejido presenta activación de cinasas MAPK, como ERK, p38 y JNK, incrementando MCP-1 que induce la migración de monocitos y activando macrófagos a M1. Estos macrófagos secretan grandes cantidades de TNF- α , que activa a los adipocitos hipertrofiados a través del receptor TNF, induciendo la liberación de adipocinas por activación NF- κ B (Donath & Shoelson, 2011; Esser *et al.*, 2014).

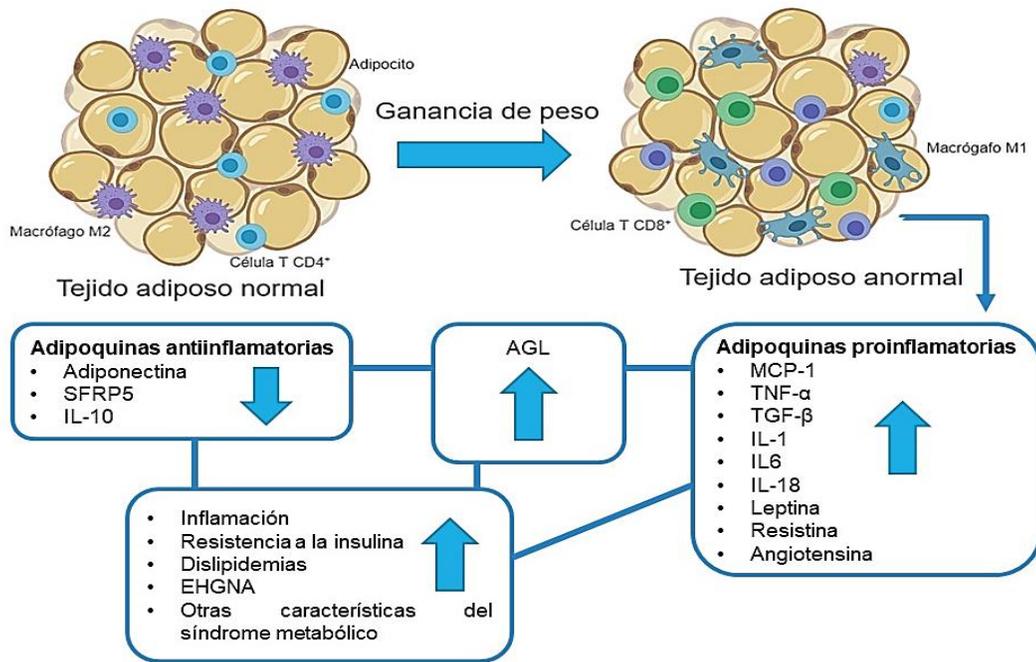


Figura 7. Exceso de nutrientes y la hipoxia de los adipocitos ocurre con el aumento de peso y la obesidad, desencadena la expresión de varios genes inflamatorios (adaptado de Jung & Choi, 2007).

4.7. Uso de productos naturales para el tratamiento del sobrepeso y obesidad

En la actualidad, los productos naturales se han convertido en una fuente importante para la obtención de biomoléculas con actividad terapéutica, para el desarrollo de nuevos fármacos, seguros y eficaces. Las plantas han sido la fuente principal de obtención de fármacos y productos medicinales; en particular, se ha estudiado una clase de compuestos polifenólicos denominados flavonoides. Estos compuesto fitoquímicos son obtenidos en la dieta y han demostrado amplios efectos: suprimir el crecimiento del tejido adiposo, inhibición de la diferenciación de los preadipocitos, estimulación de la lipólisis e inducir la apoptosis de los adipocitos, reduciendo la masa del tejido adiposo (Mohamed *et al.*, 2014).

4.7.1. Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*, amarillo) son productos naturales que pertenecen al grupo de los compuestos polifenólicos que tienen una estructura benzo-γ-pirona, derivada del ácido shiquímico y del acetato (figura 8), son sintetizados por las plantas en respuesta a las infecciones microbianas y se tienen descritos más de 4000 diferentes flavonoides (Jiang, 2016; Faggio *et al.*, 2017). Entre los efectos terapéuticos descritos se encuentran: actividad antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria, antiviral, antidiabética,

antihiperlipidémica, anticancerígena, antihipertensiva, antiaterosclerótica, hepatoprotectora y otros (Tapas *et al.*, 2008).

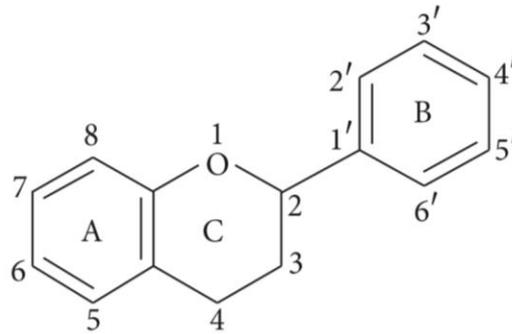
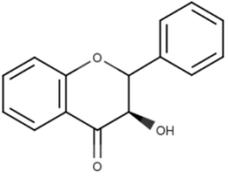
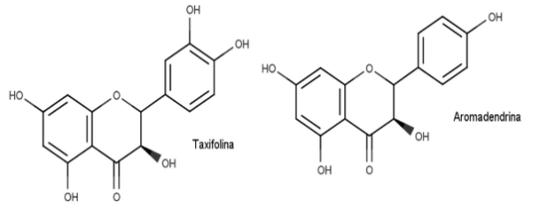
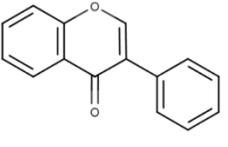
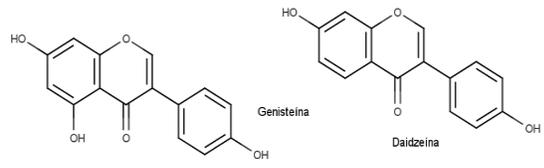
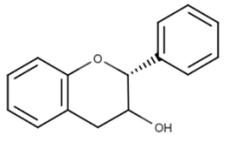
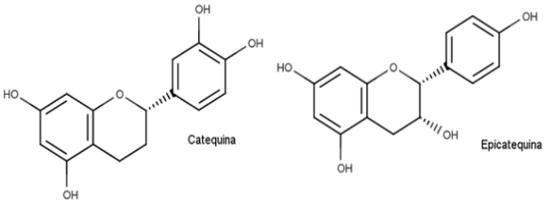


Figura 8. Estructura química base de los flavonoides.

Los flavonoides se clasifican con base a sus variaciones estructurales de acuerdo a su nivel de oxidación y al patrón de sustitución del anillo C (pirano), mientras que los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B (benceno), como se describe en la tabla 4 (Kuklinski, 2003; Kumar & Pandey, 2013).

Tabla 4. Estructura de flavonoides (Kumar & Pandey, 2013).

Grupo de flavonoide	Estructura base	Ejemplos
Flavonas		 Luteolina Crisina
Flavonoles		 Quercetina Kaempferol
Flavanonas		 Hesperetina Naringerina

Flavanonoles		
Isoflavonas		
Flavan-3-oles		

4.7.2. Crisina

Crisina (figura 9) es una flavanona de la especie vegetal *Passiflora caerulea*, conocida como flor de la pasión, también en la miel y el propóleo; a esta sustancia se le conoce una amplia actividad farmacológica: inhibidor de la aromatasas, anticancerígeno, antiviral, antiinflamatoria, neuroprotector, antidiabético, hipolipemiante, antiasmáticos y ansiolíticos (Mani *et al.*, 2018; Ramírez-Espinosa *et al.*, 2018). Habría que decir también que Satyanarayana *et al.*, 2015 observaron la normalización de glucemia, de insulina y del perfil de lípidos, y cambios en la expresión del transportador GLUT-4 en un modelo de obesidad por dieta alta en grasa-sacarosa en ratas Wistar.

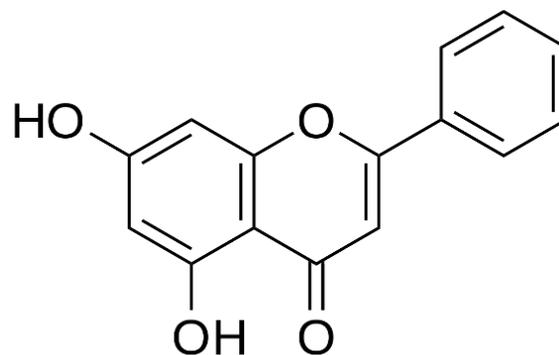


Figura 9. Estructura química de la crisina.

4.7.3. Naringenina

Naringenina (figura 10 5) es una flavanona natural que se encuentra en frutas de especies cítricas, especialmente en toronja (*Citrus paradisi*) y naranjas (*Citrus sinensis*). Este flavonoide ha demostrado tener amplios efectos farmacológicos: oxidación de los ácidos grasos, reduce la gluconeogénesis, antidiabético, antiinflamatorio, antioxidante y anticancerígeno (Cho *et al.*, 2011; Ortiz-Andrade *et al.*, 2008). Priscilla *et al.*, 2015 observaron en ratas Wistar macho alimentadas con dieta alta en grasa-estrepozotocina para inducir diabetes, la naringenina (25 mg/kg) por 45 días redujo la hiperglucemia e hiperinsulinemia, así como cambios en el perfil de lípidos y modulación de la expresión de GLUT-4 y TNF- α .

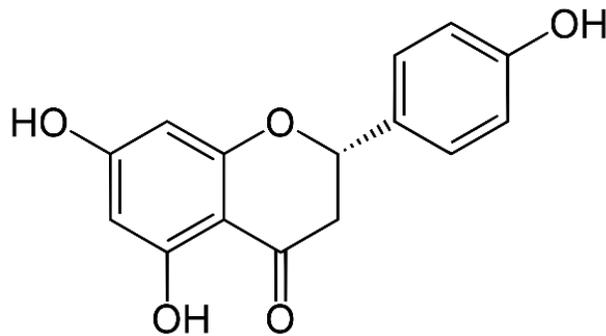


Figura 10. Estructura química de la naringenina.

4.8. Modelos animales para inducir obesidad

La alta prevalencia de obesidad en el mundo ha fomentado la búsqueda continua para comprender sus procesos fisiopatológicos, la prevención y la evaluación de nuevas moléculas para el tratamiento de obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia y síndrome metabólico, *ergo*, los modelos animales han desarrollado varios de los desórdenes fisiopatológicos de los individuos con obesidad. La inducción experimental de obesidad en modelos animales se obtiene por diferentes procedimientos, los cuales se resumen en la tabla 5 (Carmona, 2010).

Tabla 5. Clasificación etiológica de los modelos de obesidad experimenta (*Carmona, 2010*).

MODELO	EJEMPLO
Obesidad por lesión del sistema nervioso central	Hipotálamo: <ul style="list-style-type: none"> • Lesiones ventromedial • Inyección por tioglucosa de oro Tronco encefálico: <ul style="list-style-type: none"> • Lesiones electrolíticas
Modelos animales de obesidad genética	Mutación monogénica dominante <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ratón amarillo (Ay)</i> Mutación monogénica recesiva <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rata Zucker (fa)</i> Mutación poligénica espontánea <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ratón New Zealand (NZO)</i> Mutación poligénica ambiental <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ratón Berlín Obeso (BFM)</i>
Obesidad nutricional	Inducida por dieta <ul style="list-style-type: none"> • <i>Dieta de cafetería</i> • <i>Dieta alta en grasa</i>
Obesidad endocrina	Hipercortisolismo Hiperinsulinismo
Obesidad farmacológica	Ciproheptadina Clonidina
Obesidad ambiental	Restricción de la actividad física Estrés por estímulo doloroso
Obesidad estacional	Prehibernación Premigración
Otros tipos de obesidad	Viral

A pesar de que la etiología de la obesidad es compleja, diversos factores están vinculados en su desarrollo, principalmente la ingestión de alimentos con alto contenido calórico y la falta de actividad física. En este contexto, existen modelos experimentales de obesidad inducida por dietas, ampliamente descritos en la literatura, ya que puede reproducir alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad humana.

Existen varios tipos de dietas para inducir la obesidad que han demostrado su eficacia, los modelos se basan en el consumo excesivo de grasa y carbohidratos, los cuales serán mencionados a continuación:

- **Dieta alta en grasa:** utiliza ratas (*v. gr. Wistar*) o ratones (*v. gr. CD1*) alimentadas con dieta alta en grasa, la cual tiene diferentes formulaciones (emulsiones administradas

por vía oral o comida especial HFD que presenta el 60% kcal de grasa). Los animales reproducen alteraciones metabólicas; hiperglucemia, dislipidemias, hiperinsulinemia, depósitos de grasa ectópica en hígado (esteatosis hepática), aumento de peso (adiposidad) y expresión de citocinas inflamatorias del tejido adiposo (Gao *et al.*, 2015, Ai *et al.*, 2005).

- Dieta de cafetería: este modelo utiliza ratas (*v. gr.* Wistar o Sprague-Dawley) y ratones (*v. gr.* BALB/c o CD1) permitiendo a los animales libre acceso al alimento (comida estándar) y al agua, mientras se le ofrece alimentos comerciales con alto contenido energético (*v. gr.* galletas, cereal), accesibles en la sociedad occidental. Esta dieta promueve la hiperfagia voluntaria que resulta en aumento rápido de peso (adiposidad) y en parámetros prediabéticos (hiperglucemia y resistencia a la insulina). La dieta de cafetería ha mostrado ser un modelo del síndrome metabólico porque produce inflamación en tejido hepático, adiposo, dislipidemias, depósitos de grasa ectópica en hígado (esteatosis hepática), daño en el corazón y riñón (Bazzano *et al.*, 2005, Zeeni *et al.*, 2015, Sampey *et al.*, 2011).

5. JUSTIFICACIÓN

La obesidad se ha convertido en un problema de salud pública mundial, ya que su prevalencia y mortalidad han incrementado significativamente, ocasionando grandes costos para el sector salud. En nuestro país la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad pasó de 71.2% en 2012 a 72.5% en 2016; con aumento de 1.3% (ENSANUT MC 2016).

En la actualidad existen medicamentos disponibles para la obesidad, pero muchos de ellos no están disponibles para la sociedad o pueden ocasionar efectos adversos al paciente. De modo que ha surgido la necesidad de obtener nuevas alternativas terapéuticas, de origen vegetal o sintético, que actúen en blancos terapéuticos novedosos y específicos para el tratamiento controlado e integral de la obesidad y las enfermedades concomitantes.

Este trabajo pretende generar una alternativa terapéutica para esta patología y sus alteraciones metabólicas. Es por ello que se explorará la mezcla de naringenina y crisina en un modelo de obesidad generado con dieta de cafetería, para conocer sus efectos en las medidas antropométricas, en los perfiles bioquímicos, metabólicos y moleculares.

6. HIPÓTESIS

La mezcla de los flavonoides crisina y naringenina (50:50), tendrá efectos antiobesidad en ratas Wistar macho alimentados con dieta de cafetería, modificando los perfiles de glucosa, lípidos, insulina e inflamatorios.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinación el efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisina y naringenina (50:50) en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el modelo de obesidad en ratas Wistar macho alimentados con dieta de cafetería.
- Monitorear la variación de peso, el índice de masa corporal y la circunferencia abdominal de las ratas Wistar macho del grupo control y con dieta de cafetería.
- Cuantificar el consumo en gramos y contenido calórico del grupo control y con dieta de cafetería.
- Monitorear los niveles de glucemia del grupo control y con dieta de cafetería.
- Evaluar el efecto antiobesidad, antidislipidémico, antihiperlipidémico y antiinflamatorio de la mezcla crisina-naringenina (50:50) en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.
- Valorar los cambios de los parámetros somatométricos, consumo de alimento y glucemia.
- Analizar los perfiles bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, VLDL, LDL e insulina) y hepáticos (alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa).
- Determinar el peso relativo del tejido adiposo e hígado, y la evaluación histopatológica en hígado
- Determinar la expresión de genes relacionados con la obesidad, en respuesta al tratamiento con la mezcla crisina-naringenina en tejido adiposo.

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Uso y manejo de animales

Los animales utilizados para este proyecto fueron ratas macho de la cepa Wistar de 250-350 g de peso. Dichos animales fueron tratados según la norma oficial mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999)”.

9.2. Modelo murino de obesidad basado en una dieta de cafetería

Para establecer el modelo murino de obesidad con dieta de cafetería se utilizó un modelo modificado del de Fuentes-Debray (Fuentes-Debray, 2016). Se utilizaron ratas Wistar macho y se formaron 2 grupos. Un grupo (n = 6) fue alimentado con dieta estándar (CE) y el segundo grupo (n = 14) fue alimentado con dieta de cafetería (CAF), ambos con libre acceso al agua. Se midió la ingesta de alimento y agua cada 24 horas. En la tabla 6 se muestra la dieta para el modelo experimental. Los grupos de animales se dejaron en ayuno cada 15 días, previo a determinar la ganancia de peso, el delta del peso (como la diferencia entre el peso final e inicial) y glucosa en ayuno. Se midió la circunferencia abdominal, así como la longitud hocico-ano para calcular el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo con lo reportado por Novelli *et al.*, 2006.

Tabla 6. Productos ofrecidos durante la dieta de cafetería.

PRODUCTO	GRAMOS (g)	CALORÍAS (cal)
Bimbuñuelos®	15.6	63
Canapinas®	29.7	130
Cereal chocolate	30	121
Cereal Fruts	30	112
Chicharrón cerdo	100	544
Chicharrones frituras	28	190
Choco donas®	33	140
Chocorroll®	50	176
Dona®	26.25	120
Doraditas®	19.33	97
Lord®	9.8	46
Mantecada®	31.25	136
Pachoncito®	70	255
Panque®	50	187
Polvorones®	18.5	92
Rollo®	37.5	124
Submarino®	35	116
Tuinky®	38	141

9.3. Curvas de tolerancia a la glucosa

Para analizar el metabolismo de la glucosa entre los grupos de dieta (CE y CAF), se hicieron curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) cada cuatro semanas de haber iniciado con la dieta de cafetería. Para ello, las ratas se dejaron en ayuno de 16 horas (Brante *et al.*, 2011). Se registró la glucosa basal (tiempo 0) previo a la administrar, por vía oral, glucosa disuelta en agua (2 g/kg), después se registró la glucemia a tiempos 0.5, 1, 2, y 3 horas.

9.4. Tratamiento con la mezcla de crisina-naringenina (50:50)

Establecidos los grupos experimentales se hicieron pruebas para determinar el efecto antihiper glucémico. Los compuestos crisina y naringenina fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich Co. Se formaron tres grupos, un grupo CE (n = 6) no fue administrado. Dos grupos de CAF fueron administrados: un grupo CAF-Vh (n = 5) con el vehículo (tween 80 al 10 %) y el segundo grupo CAF-Tx (n = 5) tratado con la mezcla de crisina-naringenina (50:50) disuelto en vehículo, la administración fue por vía oral utilizando una sonda especial para rata, el tratamiento duró 20 días.

Los animales se dejaron en ayuno previo cada 7 días, para determinar la ganancia de peso y glucosa en ayunas. Se midió la circunferencia abdominal, el IMC y una CTG.

9.5. Examen histológico

Al terminar el tratamiento, las ratas se anestesiaron para obtener hígado y tejido adiposo. El hígado se lavó con solución salina (0.9%) y fijados en formol (3.6%) para mantener su estructura y evitar el *post mortem* (autólisis o desintegración). Previo a la inclusión en parafina, los tejidos se deshidrataron en alcohol a concentración creciente (50%, 70%, 80%, 95% y absoluto) y xileno, para eliminar el exceso de agua. Los tejidos se prepararon para la inclusión en parafina y cortados con microtomo en láminas delgadas (3 μ m), para ser observados en el microscopio. Los cortes se colocaron sobre la superficie de un baño de agua a (38 °C, donde se fijaron al portaobjetos y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones teñidas son observadas en el microscopio y las imágenes son capturadas.

Los estudios histológicos fueron en colaboración con la Dra. Blanca Bazán Perkins, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

9.6. Peso relativo del hígado y del tejido adiposo

Al finalizar el tratamiento se obtuvo el hígado y los depósitos de grasa abdominal, para obtener el peso relativo con la siguiente fórmula:

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{tejido (gramos)}}{\text{peso corporal (gramos)}} \times 100$$

El resultado se expresó en gramos/100 gramos de peso (g/100g).

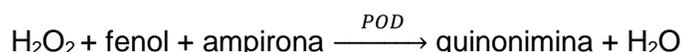
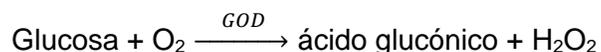
9.7. Determinación de los perfiles bioquímicos

Se extrajo la sangre por punción cardíaca, y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para obtener el suero y almacenarlo a -20°C. En el suero se determinaron: glucosa (Glu), colesterol (CT), triglicéridos (Tg), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) e insulina.

Los análisis bioquímicos fueron en colaboración con la Dra. Sara García Jiménez, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

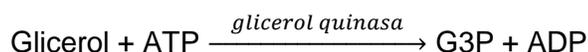
A continuación se describe el fundamento de cada prueba realizada:

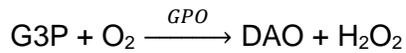
- La glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa (GOD) para formar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El H₂O₂ reacciona con la 4-amino-fenazona en presencia de la peroxidasa (POD) para formar la quinonimina, este compuesto colorimétrico es medido a 505 nm.



La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.

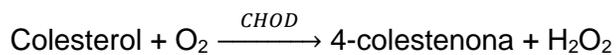
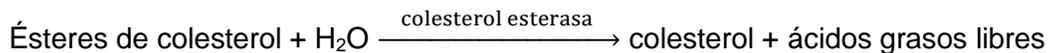
- Los triglicéridos contenidos en el suero son hidrolizados por la enzima lipoproteína lipasa (LPL), para producir glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por la enzima glicerol cinasa para producir glicerol-3-fosfato (G3P), el cual es oxidado por la glicerol-3-oxidasa (GPO) para formar la 4-aminofenazona (4-AF) más peróxido de hidrógeno, este se une a la peroxidasa para dar una quinona que se cuantifica a 505 nm.





La intensidad del color es proporcional a la concentración de triglicéridos

- Los ésteres de colesterol son oxidados por la colesterol esterasa para formar colesterol y ácidos grasos libres. El colesterol reacciona con la colesterol oxidasa (CHOD) para formar 4-colestenona y H_2O_2 , este reacciona con la peroxidasa, 4-aminofenazona y fenol para formar la quinonimina, este compuesto colorido se mide a 505 nm.



La intensidad del color es proporcional a la concentración de colesterol.

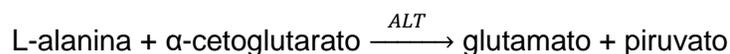
- Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), método de precipitación con magnesio: Las HDL se separan precipitando las LDL y VLDL, por agregación de sulfato de dextran de PM 50000 y iones Mg. En el sobrenadante después de centrifugar quedan las HDL y se determina el colesterol, con el sistema Colesterol oxidasa/peroxidasa por colorimetría según Trinder (fenol/4-aminofenazona).
- La determinación de VLDL y LDL fue de acuerdo con la fórmula de Friedewald (Priscilla *et al.*, 2015):

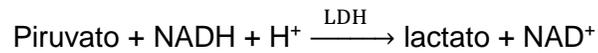
$$VLDL = \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$$

$$LDL = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

La fórmula de Friedewald es un método indirecto que permite conocer la fracción LDL, si se conoce el colesterol total, la fracción HDL y los triglicéridos.

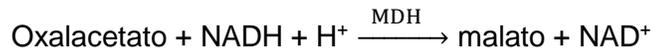
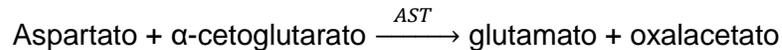
- La alanina aminotrasferasa (ALT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato para formar glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato por lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH, este compuesto es medido a 340 nm.





La disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado con espectrofotómetro es proporcional a la actividad de ALT.

- La aspartato aminotransferasa (AST) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato para la formar glutamato y oxalacetato. El oxalacetato es reducido a malato por malato deshidrogenasa (MDH) y NADH, este compuesto es medido a 340 nm.



La disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado con espectrofotómetro, es proporcional a la actividad de AST.

- Para la cuantificar insulina, se usó un *kit* de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) de rata/ratón Merck (EZRMI-13K).
- **Extracción del ARN**

La extracción de ARN fue de acuerdo con Chomezynski y Sacchi, 1987, el cual se basa en el aislar el ácido nucleico con fenol-cloroformo e isotiocianato de guanidina (TRIzol™ Reagent®). La extracción del ARN se hizo al homogenizar (D1000 homogenizer) el TA en 1 ml de Trizol a 4°C y precipitan ARN, ADN y proteínas (previo al cloroformo, se separó el TRIzol y la grasa). Después se adicionó 200 μ L de cloroformo, se centrifugó a 1400 rpm durante 15 minutos a 4°C, el cloroformo separó tres fases, una acuosa en la parte superior transparente (contiene ARN), una interfase (ADN) y una orgánica inferior roja (proteínas). Se extrajo la fase acuosa y se adicionó 500 μ L de isopropanol absoluto para precipitar el ARN y se centrifugó a 1400 rpm durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% para eliminar residuos de sal del sedimento de ARN (se dejó reposar por 24 horas), durante 10 minutos se centrifugó la muestra a 1200 rpm para precipitar el ARN, se decantó el etanol y se dejó secar durante 15 minutos para eliminar el etanol. El ARN se disolvió en 20 μ L de *RNA storage solution* (buffer de citrato de sodio 1M, Ambion).

9.8. Evaluación de la cantidad, pureza y calidad del ARN total

La cuantificación de ARN total fue por absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro Epoch (Biotek). Debido a que las reacciones de amplificación pueden variar en función de

la integridad y pureza del ARN total, este no debe estar degradado ni contaminado con proteínas o ADN. Por lo que se determinó la pureza del ARN total midiendo la relación existente entre la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) y a 280 nm (proteínas), el cálculo de la concentración de ARN se estimó como:

$$\text{Absorbancia} \times \text{Ácido nucleico} \times \text{Factor de dilución}$$

Las muestras tuvieron pureza de 1.8 a 2, que indica buena pureza de ARN, ya que un valor menor que a 1.8 significa que el ARN está contaminado (principalmente con proteínas).

Para verificar la calidad del ARN extraído, se hizo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X y se tiñó con SYBR Green, en el transiluminador UV (Gel Doc 2000 Bio Rad) se observaron las dos bandas bien definidas que corresponden al ARN ribosomal 28S y 18S. Se usó el ARN ribosomal como referencia, ya que representa 85-95% de todo el ARN celular, mientras que el ARN mensajero es 2-5%.

9.2. Transcripción reversa de ARN a ADNc (síntesis y amplificación)

La síntesis del ADNc, se hizo con el *kit Thermo scientific revert aid RT kit* (Thermo Scientific), usando 1 µg de ARN total en 20 µL de volumen total. La reacción se incubó a 25°C durante 5 minutos, seguido de 42°C durante 55 minutos en un termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700). La reacción se detuvo a 70°C durante 15 min y se enfrió a 4°C durante 5 min.

9.3. PCR-Tiempo real

El ADNc se amplificó en 4 µL de volumen final, conteniendo: 2.5 µL del *DNA Master Mix SYBR Green I* (Roche®), el cual contiene máxima SYBR Green qPCR amortiguadores (KCl, (NH₄)₂SO₄), Taq DNA polimerasa, dNTP's, MgCl₂... elementos necesarios para la amplificación, 500 µL de cada cebador y 500 µL de agua.

La secuencia de los cebadores utilizados:

Adiponectina	F-CCAATGTTCCCATTCGCTT;R-TAGTAGAGCCCCGGAATGTT
IL-1β	F-TATGTCTTGCCCGTGGAGCTT;R-GTCACAGAGGACGGGCTCTT
PPAR-γ	F-CCAGAGTCTGCTGATCTGCG;R-GCCACCTCCTTTGCTCTGCTC

Como gen de referencia se utilizó β-actina (F-CCTGAGCGCAAGTACTCTGTGT; R-GCTGATCCACATCTGCTGGAA). La reacción fue llevada al equipo de PCR System 7900HT bajo las siguientes condiciones pre incubación y desnaturalización a 95°C durante 10 min.

Al finalizar el programa de termociclador, se agregó una curva de disociación para determinar la temperatura de fusión (T_m *Melting temperature*), la cual permite identificar la especificidad del PCR por aparición de un solo producto de amplificación.

9.4. Análisis de los datos

Los resultados de expresión se obtuvieron comparando los valores de Ct (ciclo umbral) de las curvas de amplificación para los tejidos extraídos de los grupos.

Se normalizó la cantidad relativa de cada muestra respecto al gen de referencia, con la fórmula:

$$\Delta CT = CT (\text{específico}) - Ct (\text{referencia})$$

Donde Ct (específico) y Ct (referencia) es el ciclo al cual la muestra y el de referencia, respectivamente, alcanzan el nivel umbral de fluorescencia en el PCR-tiempo real. El cálculo determina la eficiencia de amplificación entre diferentes concentraciones de ARNm, tanto para la muestra como para el gen de referencia, y confirma que para una misma muestra, la proporción obtenida entre el ARNm estándar y la referencia será siempre la misma. Luego procedemos al cálculo de los cambios relativos en la expresión de un gen específico ($\Delta\Delta Ct$), de acuerdo a la fórmula:

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct (\text{específico}) - \Delta Ct (\text{referencia})$$

9.5. Análisis estadístico

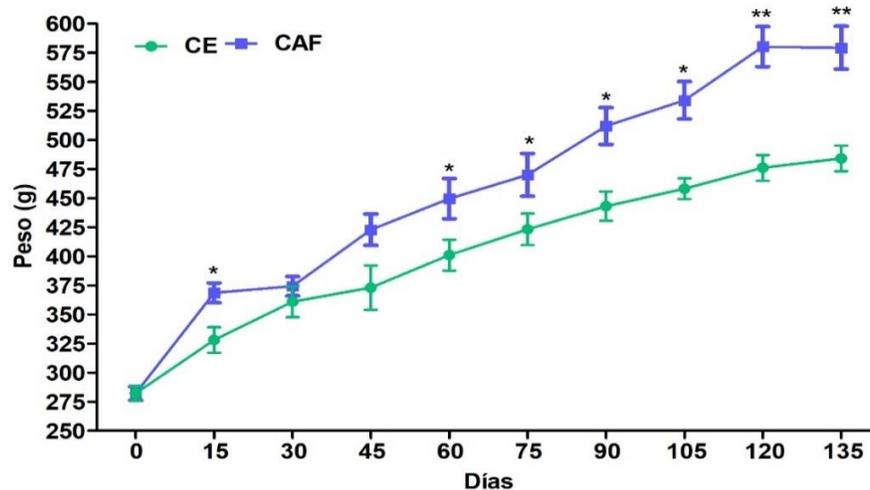
Para identificar las diferencias significativas entre los grupos, se obtuvo la media aritmética con su respectivo error estándar de la media (S.E.M.). La comparación de los grupos se hizo con la prueba *t*-Student o análisis de varianza (ANOVA), dependiendo del número de grupos, seguido de la prueba *post hoc* Mann-Whitney o Bonferroni, para el cual se empleó el programa estadístico GraphPad Prism 5.01. Se consideraron diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Modelo murino de obesidad basado en una dieta de cafetería

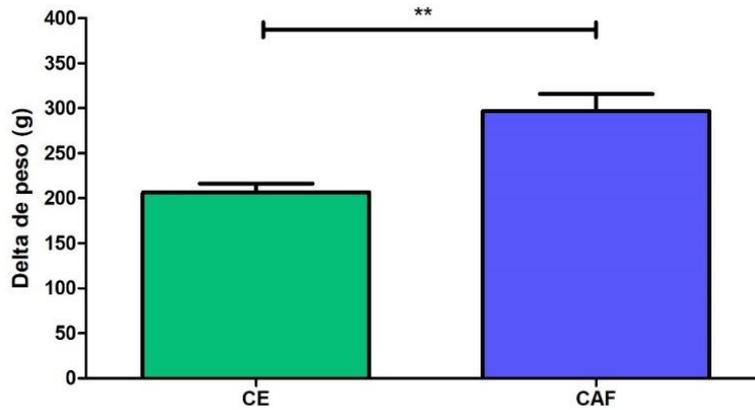
El propósito de este estudio fue obtener un modelo de obesidad inducida por alimentación hipercalórica de una “dieta de cafetería” en ratas macho de la cepa Wistar. Ya

se ha descrito que este modelo es ventajoso porque asemeja a la obesidad humana inducida por la hiperfagia de alimentos ricos en contenido energético, al inducir una ganancia de peso y reproducir alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad (Bazzano *et al.*, 2015; Ramalho *et al.*, 2017; Sampey *et al.*, 2011). Para identificar si la dieta de cafetería acelera la ganancia de peso corporal en ratas Wistar, se compararon ambos grupos de animales: un grupo alimentado con dieta estándar (CE) y otro alimentado con dieta de cafetería (CAF), durante 135 días que duró el monitoreo, para la obtención del modelo de obesidad. La gráfica 1 compara ambos grupos, donde CAF aumentó el peso corporal desde el día 15 en comparación con el grupo CE; manteniendo se esta tendencia hacia el día 45 y con aumento del 19.6% en el día 135 ($p < 0.01$). Esta ganancia de peso corporal se debe a la ingesta hipercalórica con la dieta de cafetería, lo que aumentó el tamaño de los depósitos de tejido adiposo, de acuerdo a lo reportado por Sabater *et al.*, 2016 & Sampey *et al.*, 2011.



Gráfica 1. Efecto del consumo crónico de la dieta estándar (CE) y dieta de cafetería (CAF), sobre el peso de ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ vs. CE.

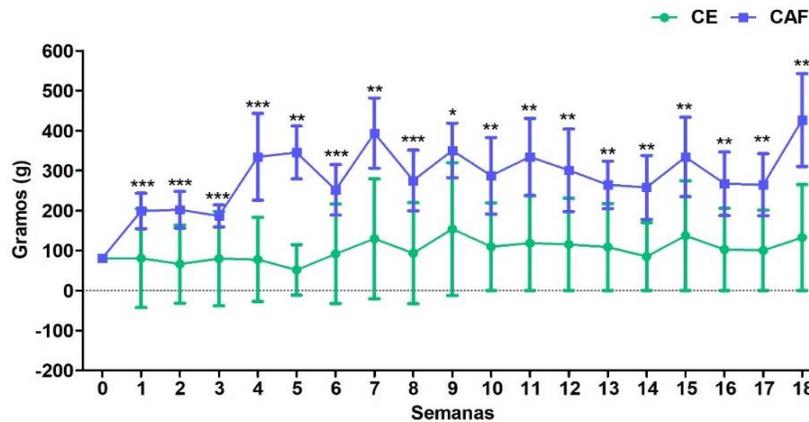
Para apoyar los datos anteriores, se calculó el delta de peso de ambos grupos, con el fin de observar la ganancia durante el monitoreo del modelo de obesidad (Macedo *et al.*, 2012), en la gráfica 2 se observa la ganancia de peso corporal en CAF (343.6 g) en comparación con CE (206.6 g), lo que sugiere que el consumo excesivo de nutrientes hipercalóricos en CAF aumenta el peso corporal 66.3% ($p < 0.01$).



Gráfica 2. Delta de peso (*peso final – peso inicial*) del grupo CE y CAF, sobre el peso de ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; ** $p < 0.01$ vs. CE.

10.2. Consumo en gramos y conteo calórico

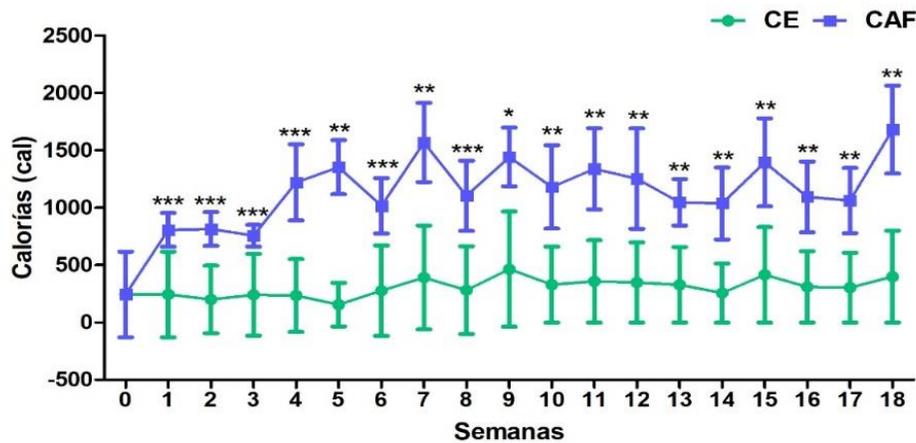
Es importante mencionar que se hizo el conteo de gramos consumidos y de contenido calórico para ambas dietas. Los resultados en la gráfica 3 muestran el consumo en gramos de los dos grupos. El grupo CE se mantuvo constante durante el monitoreo, mientras que en el grupo CAF el consumo fue mayor ($p < 0.01$; $p < 0.001$).



Gráfica 3. Gramos consumidos del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. CE.

El consumo de calorías para cada grupo se muestra en la gráfica 4, donde se observa un aumento significativo ($p < 0.01$; $p < 0.001$) desde la semana 1 a la 18 en el grupo CAF, en comparación con el grupo CE. El grupo CE mantuvo su ingesta calórica constante durante las 18 semanas, como se observa en la gráfica.

De los resultados obtenidos se desprende (gráficas 1 y 2) que el grupo CAF consumía más gramos, tenía mayor ingesta de contenido energético y aumentaba de peso a un ritmo más rápido que el grupo CE (gráfica 3). Shafat *et al.*, 2009 observaron que la variabilidad de los alimentos estimulaban la hiperfagia y no la palatabilidad. Además, encontró correlación significativa entre el contenido calórico de los alimentos presentados y la ingesta de energía, que influyen en la rápida ganancia de peso. Concordando con nuestros resultados, se demuestra que la dieta a la que fueron sometidas las ratas promueve la hiperfagia, resultando en un rápido aumento de peso corporal.

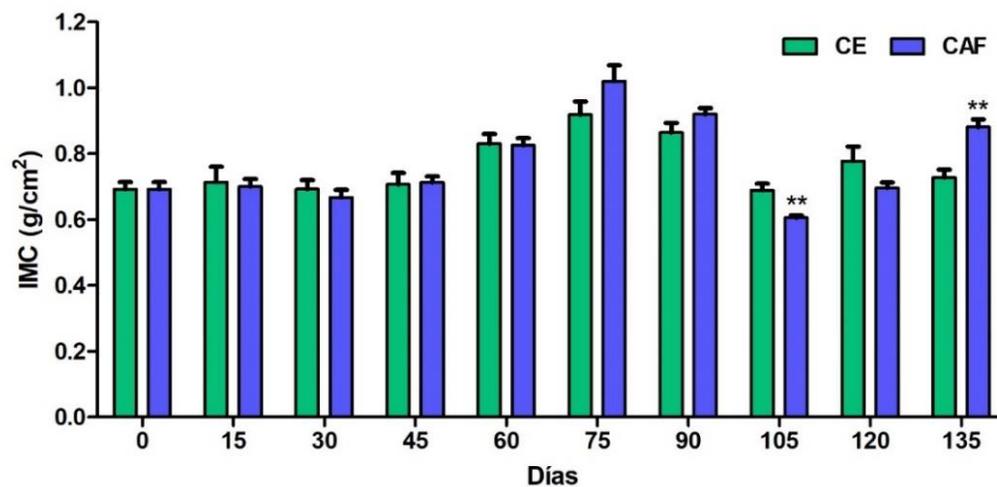


Gráfica 4. Calorías consumidas del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. CE.

10.3. Medidas somatométricas (IMC y circunferencia abdominal)

En la actualidad, la ganancia de peso corporal o el consumo excesivo de contenido energético en relación con los animales control se ha tomado como criterio para decir que un animal es obeso, en contraste a lo anterior, no existe puntos de corte que estimen que las ratas tienen normo peso u obesidad. Un indicador muy utilizado es el índice de masa corporal (IMC), que permite clasificar el grado de obesidad en humanos. El IMC en ratas es similar al de los humanos, este se determina dividiendo el peso (g) y el cuadrado de la longitud del ano a la nariz (cm), de acuerdo a lo reportado por Novelli *et al.*, 2007, donde quienes observaron que ratas Wistar macho alimentadas con dieta estándar llegaron a tener 0.68 g/cm^2 de IMC. Por el contrario, las ratas que consumieron sacarosa en agua (30%) o dieta alta en carbohidratos (19.93% de proteína, 15.39% grasa, 57.50% carbohidratos y 2.81% fibra), su IMC aumentó hasta 0.82 g/cm^2 y 0.72 g/cm^2 , respectivamente.

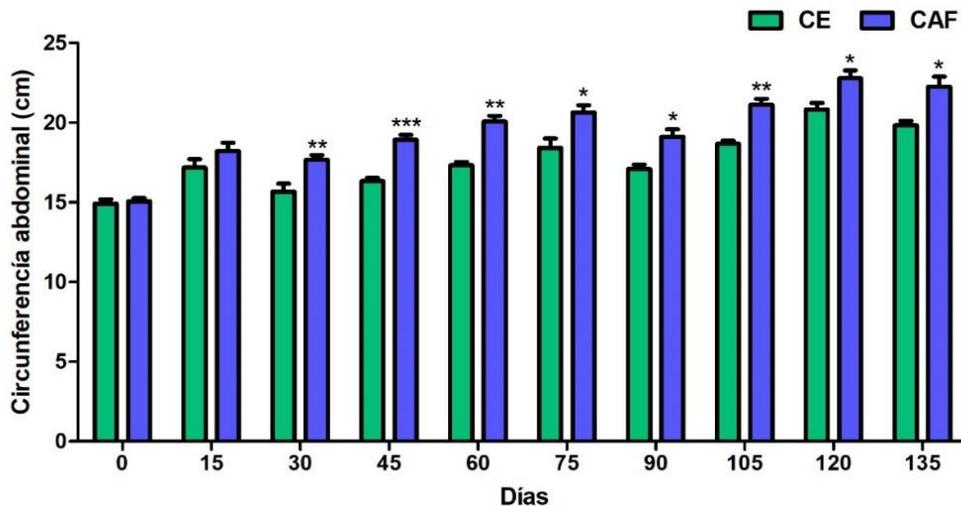
Los resultados de la gráfica 5 muestran el IMC de ambos grupos, desde el día 0 al día 135. Donde el IMC del grupo CAF (0.88 g/cm²) fue superior a la del grupo CE (0.72 g/cm²) desde el día 75, lo que permite suponer que el consumo excesivo de alimento rico en contenido calórico afecta este parámetro somatométrico; así, hubo aumento de 14.2% del grupo CAF con respecto a CE en el día 135 ($p < 0.01$). Sin embargo, esta variable es alterada conforme a la edad, cepa y tipo de modelo para generar obesidad, ya que se observaron cambios en las mediciones somatométricas en ambos grupos en los días 105 y 120, a saber, un aumento en el peso y longitud. En contraste, los valores con la dieta de cafetería no coinciden con los reportados por Novelli *et al.*, 2007, posiblemente por diferencia de edad de las ratas y el tipo de dieta, a pesar de estas variables, aumentó el IMC en las ratas alimentadas con dieta de cafetería.



Gráfica 5. Índice de masa corporal (IMC) del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; ** $p < 0.01$ vs. CE.

Con base a los resultados por Novelli *et al.*, 2007, las ratas Wistar alimentadas con dieta estándar tuvieron circunferencia abdominal de 17.2 cm, mientras que los alimentados con dieta alta en carbohidratos fue de 23.5 cm. Los resultados en la gráfica 6 muestran la circunferencia abdominal de ambos grupos, donde CAF tuvo 18.2 cm, y el grupo CE 17.1 cm desde el día 15, sin mostrar cambios significativos; habría que decir que en los días 30, 45, 60, 75, 105 y 135 hubo aumento significativo ($p < 0.05$; $P < 0.01$) de IMC del grupo CAF, indicando mayor grasa intraabdominal; en cuanto al día 135 el grupo CAF (CE 19.8 cm y CAF 22.2 cm) tuvo aumento significativo ($p < 0.01$) del 12.1%.

Los resultados (IMC y circunferencia abdominal) durante el monitoreo con dieta de cafetería en comparación con los datos de Novelli *et al.*, 2007, indican que la dieta CAF es idónea para inducir obesidad en ratas Wistar macho.

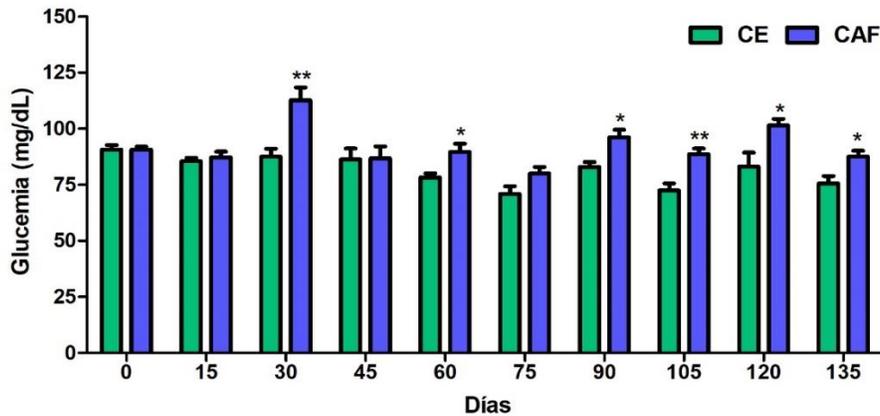


Gráfica 6. Circunferencia abdominal del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. CE.

10.4. Hiperglucemia en ratas con dieta de cafetería

La obesidad se considera como un factor de riesgo para desarrollar resistencia a insulina y diabetes tipo 2. El incremento del tejido adiposo se ha relacionado con el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, que junto a los ácidos grasos, parecen ser los responsables del desarrollo de la resistencia a insulina (Kahn *et al.*, 2006).

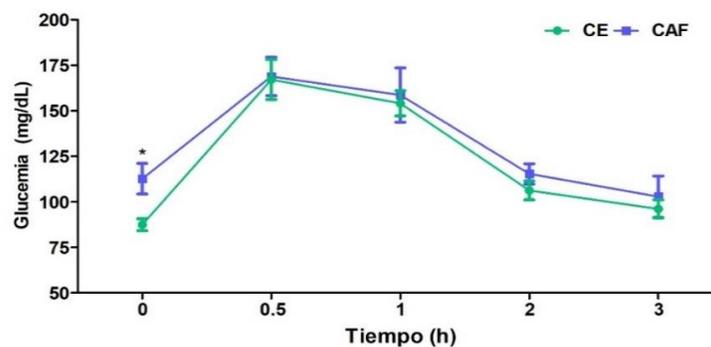
En la gráfica 7 se describe el monitoreo glucémico durante la dieta de cafetería, donde no hubo cambios de glucemia en ayunas durante 15 días, por el contrario, en el día 30 hubo elevación de glucosa en el grupo CAF ($p < 0.001$), pero se normalizó en el día 45 al igual que el grupo CE. En los días posteriores hubo glucemia elevada en comparación con CE, siendo significativa en el día 120 ($p < 0.05$). Estos datos sugieren que después de 2 meses de dieta hipercalórica hay alteraciones en la glucemia en ayunas.



Gráfica 7. Glucemia en ayunas del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. CE

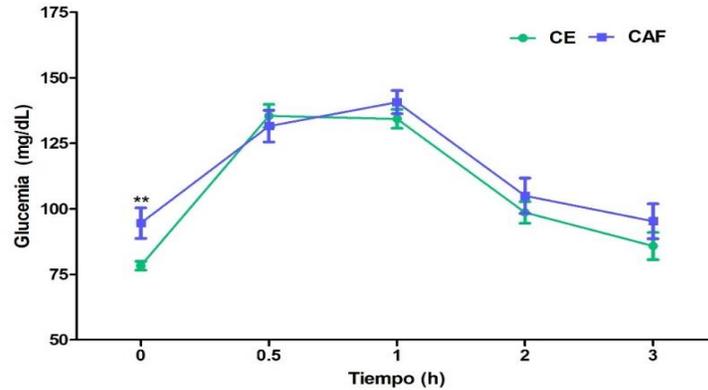
Las curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) determinan la capacidad del organismo para mantener normo-glucemia después de una carga oral de glucosa, si esto no sucede, se considera que hay intolerancia a la glucosa, la cual se observa en pacientes con diabetes tipo 2 (Ruiz-Reyes & Ruiz-Argüelles, 2017).

Las CTG se hicieron cada cuatro semanas para evaluar los efectos de la dieta de cafetería en la glucemia. Los resultados en la cuarta semana se ven en la gráfica 8, después de cuatro semanas los animales del grupo CAF tuvieron glucemias mayores al inicio de la CTG, con aumento del 22.3% vs. CE, ($p < 0.05$); ambos grupos alcanzaron su pico hiperglucémico 0.5 h postcarga y glucemias equivalentes durante el monitoreo, sin diferencia significativa.



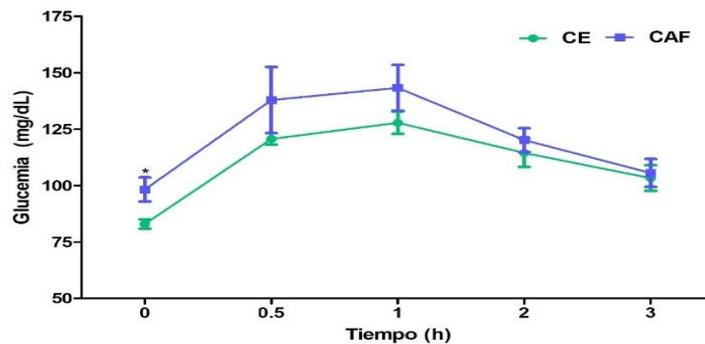
Gráfica 8. Curva de tolerancia a la glucosa a la cuarta semana del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ vs. CE. ABC para el grupo CE 519.5 y CAF 550.8

A las ocho semanas se hizo otra CTG (gráfica 9), los animales del grupo CAF aumentaron 17.1% al inicio de la CTG ($p < 0.01$). El grupo CE alcanzó su pico hiperglucémico a 0.5 h, y el grupo CAF a 1 h, hay que mencionar que a 3 h el grupo CAF no alcanzó el basal es que las del grupo CE con 9.8% aumento, sin diferencia significativa.



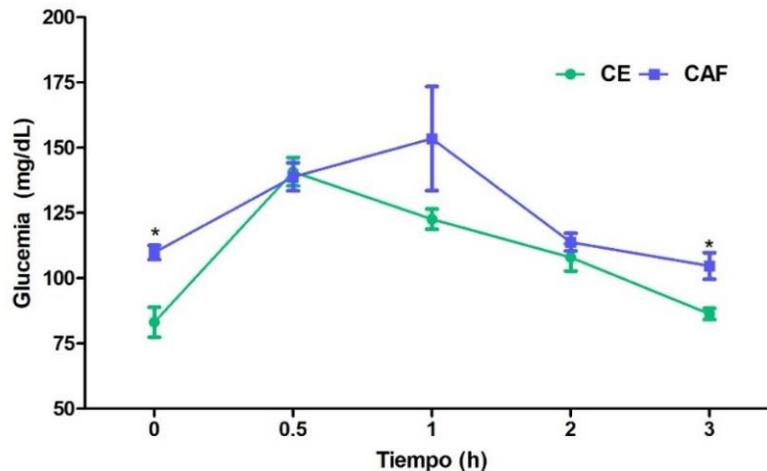
Gráfica 9. Curva de tolerancia a la glucosa a la octava semana del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; ** $p < 0.01$ vs. CE. ABC para el grupo CE 450.6 y CAF 472.2

La gráfica 10 muestra resultados en la semana dieciséis de la dieta de cafetería. Los animales del grupo CAF tuvieron glucemias mayores (15.5%) al inicio de la CTG, que el grupo CE ($p < 0.05$); además, tardó en disminuir la glucemia hasta la hora 3, sin diferencia significativa. El área bajo la curva (ABC) se calculó para determinar la glucemia durante las CTG: el ABC del grupo CAF (503.2) fue 9.3% mayor que la del grupo CE (456.2).



Gráfica 10. Curva de tolerancia a la glucosa a la semana dieciséis del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ vs. CE. ABC para el grupo CE 456.2 y CAF 503.2

Como se observa en la gráfica 11, los animales con dieta CAF aumentaron 24.3% al inicio de la CTG, sin diferencia significativa; el grupo CE alcanzó su pico hiperglucémico a la 0.5 h, y el grupo CAF fue a 1 h, con 20.1% de aumento ($p < 0.05$). Por otro lado, en la hora 3 el grupo CAF no alcanzó la glucemia basal del grupo CE, con 17% de aumento. En cuanto a la ABC del grupo CAF (513.6) fue 11.1% mayor que el grupo CE (456.3).



Gráfica 11. Curva de tolerancia a la glucosa a la semana dieciocho del grupo CE y CAF en ratas Wistar macho. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 14$; * $p < 0.05$ vs. CE. ABC para el grupo CE 456.3 y CAF 513.6

Las CTG son importantes para evaluar la absorción y metabolismo de glucosa. El grupo de animales con dieta CAF tuvieron glucemias altas al inicio de las CTG, pero en las semanas dieciséis y dieciocho (gráficas 13 y 14) se observaron alteraciones.

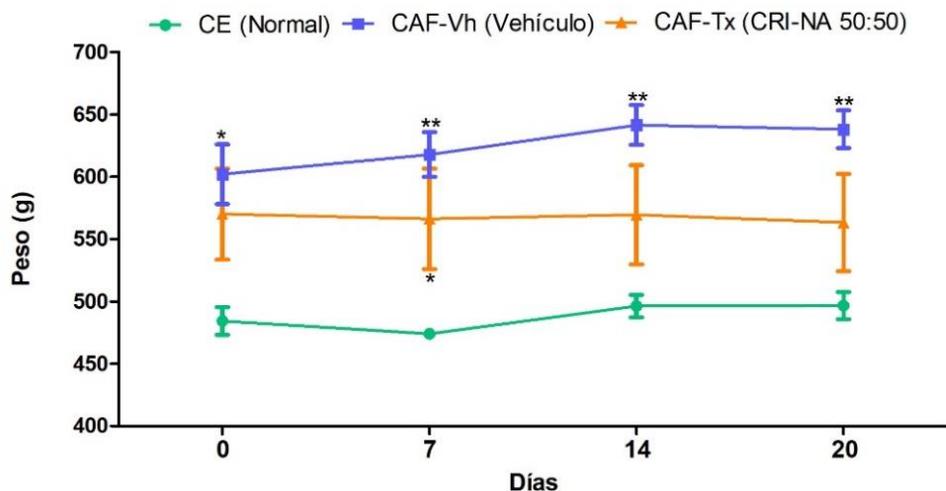
Existe evidencia que demuestra que las ratas Wistar, expuestas a una dieta de cafetería prologada, tuvieron hiperglucemia y resistencia a la insulina en la semana 15, comparadas con el grupo de dieta control (Sampey *et al.*, 2011). Por su parte, Brandt *et al.*, 2010 describen que después de 12 semanas con dieta de cafetería, las ratas Wistar tuvieron glucosa en ayunas alterada, intolerancia en CTG y resistencia a la insulina. Maeda Júnio *et al.*, 2018 observaron que durante 14 semanas con dieta de cafetería, los animales tuvieron glucógeno hepático alto y esteatosis hepática, como factores que contribuyen a la hiperglicemia. Considerando que la insulina inhibe la gluconeogénesis, y en pacientes con hígado graso no alcohólico la señalización por insulina está dañada, se traduce en aumento en la gluconeogénesis hepática e hiperglucemia persistente. En pacientes con diabetes tipo 2, la gluconeogénesis es la fuente principal de producción de glucosa, mientras que la glucogenólisis no contribuye (Hatting *et al.*, 2018).

Esta evidencia concuerda con los resultados durante el monitoreo glucémico en ayunas (gráfica 7) y de las CTG (gráficas 8-11), al demostrar que el consumo prolongado con dieta de cafetería, predispone a desarrollar parámetros prediabéticos. La posible causa es la acumulación de Tg en hígado, que origina la esteatosis hepática y resistencia a la insulina.

10.5. Monitoreo de peso con la mezcla crisina:naringenina

El tratamiento con la mezcla crisina:naringenina (50:50) fue para observar posibles efectos antiobesidad, antihiperoglucémicos e hipolipemiantes. Se formaron tres grupos experimentales (n = 6, n = 5): CE (dieta estándar), CAF-Vh (dieta de cafetería, vehículo Tween 80 al 10%) y CAF-Tx (dieta de cafetería, con la mezcla crisina:naringenina 50:50), los tres grupos fueron administrados por vía oral, bajo las mismas condiciones experimentales.

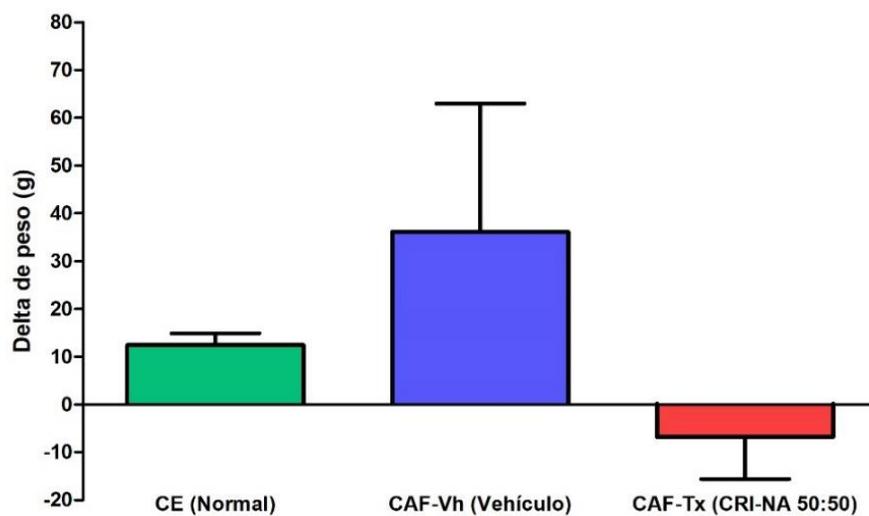
Durante el periodo experimental se monitoreó el peso corporal de los tres grupos (gráfica 12); el grupo CE aumentó de su peso corporal en el día 14 al día 20, la cual puede estar relacionado con la edad de la ratas, mientras que el grupo CAF-Vh tuvo diferencia con respecto al grupo CE ($p < 0.01$), al aumentar gradualmente desde el día 7. Por otra parte, el grupo CAF-Tx tuvo diferencia en el día 7 ($p < 0.05$), pero en el día 20 los animales disminuyeron su peso corporal, sin-diferencia significativa.



Gráfica 12. Efecto del consumo crónico del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho de la cepa tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. CE.

La ganancia o pérdida de peso corporal de los tres grupos experimentales fue calculado con el delta de peso ($peso\ final_{día\ 20} - peso\ inicial_{día\ 0}$). Los resultados en la indicaron que el grupo CAF-Vh (36.1 g) tuvo ganancia de peso corporal con respecto al grupo CE, mientras que el grupo CAF-Tx (-6.8 g) disminuyó su peso corporal comparando con el grupo CE y el CAF-Vh, los datos no mostraron diferencia significativa (gráfica 13).

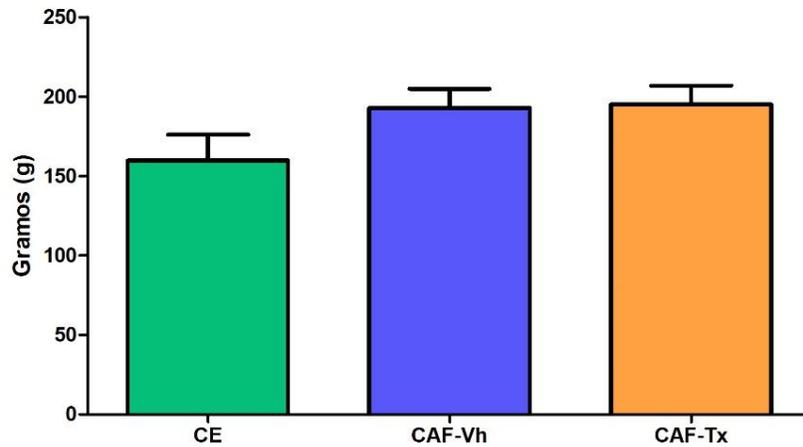
Existe pocos reportes del uso antiobesidad de los flavonoides crisina y naringenina en modelos murinos; como la evaluación en ratas Wistar de diferentes edades (2, 10 y 20 meses), al aumentar su peso corporal conforme a la edad, pero al ser tratadas con crisina (20 mg/kg) por 4 semanas disminuyó el peso corporal (Farkhondeh *et al.*, 2019). Por otro lado, naringenina (25 mg/kg) ya ha mostrado efecto antiobesidad en ratas Wistar con dieta alta en grasa-diabetizadas (Priscilla *et al.*, 2015). En este contexto, nuestros datos (gráficas 12 y 13) sugieren que la mezcla crisina:naringenina disminuye la ganancia de peso en animales sometidos a dieta hipercalórica como la dieta de cafetería, y su uso podría ser un tratamiento para disminuir el peso corporal.



Gráfica 13. Delta de peso ($\text{peso final}_{\text{día } 20} - \text{peso inicial}_{\text{día } 0}$) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; * $p < 0.05$ vs. CE.

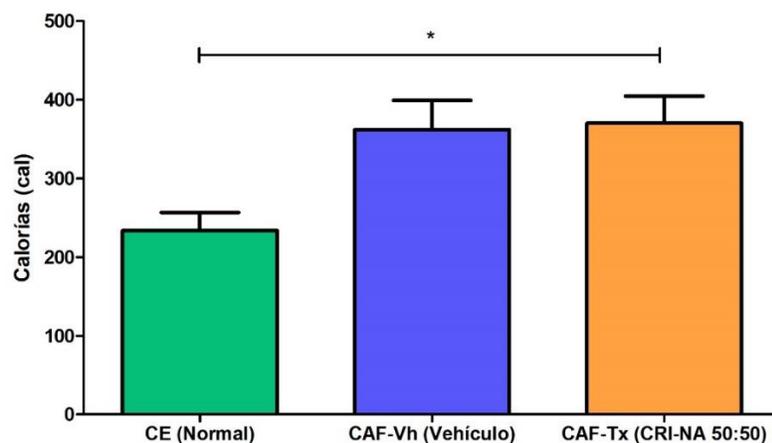
10.6. Consumo en gramos y conteo calórico durante el tratamiento

El conteo de gramos consumidos y el conteo calórico para los tres grupos fueron calculados. Los resultados muestran el consumo en gramos de los tres grupos (gráfica 14); el grupo CE mantuvo un consumo inferior en comparación con el grupo CAF-Vh y el CAF-Tx.



Gráfica 14. Gramos consumidos del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; * $p < 0.05$ vs. CE.

En la gráfica 15 se observa que los grupos CAF-Vh y el CAF-Tx consumieron más calorías que el grupo CE.



Gráfica 15. Calorías consumidas del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; * $p < 0.05$ vs. CE.

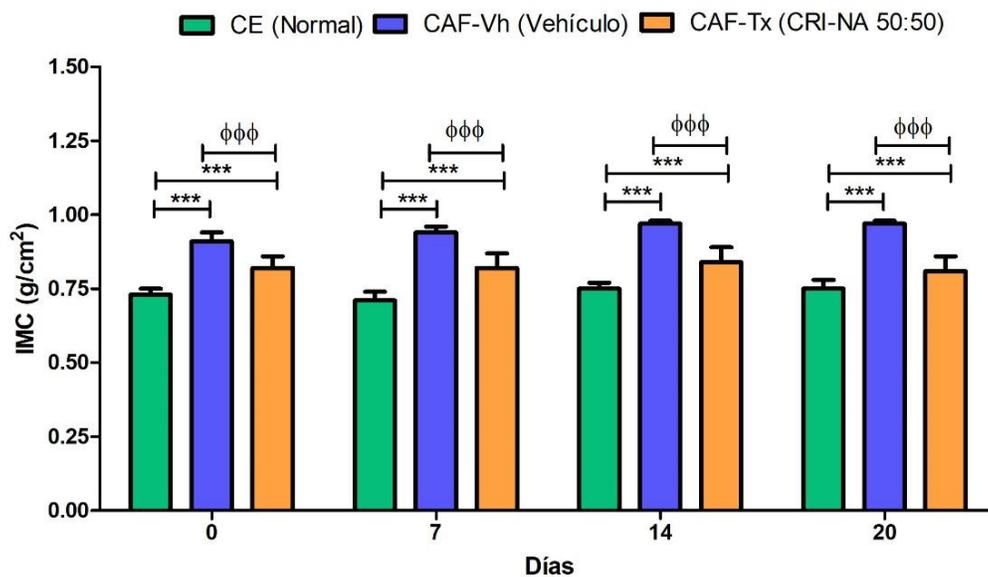
10.7. Medidas somatométricas durante el tratamiento

Se determinaron los parámetros somatométricos (IMC y circunferencia abdominal) durante los 20 días que duró el tratamiento con la mezcla crisina:naringenina.

El IMC se detalla en la gráfica 16, los animales del grupo CAF-Vh (0.97 g/cm^2) tuvieron aumento del IMC con respecto al grupo CE (0.75 g/cm^2 ; $p < 0.001$), alcanzando 29% de aumento del en el día 20; así mismo, el grupo CAF-Tx (0.81 g/cm^2) tuvo

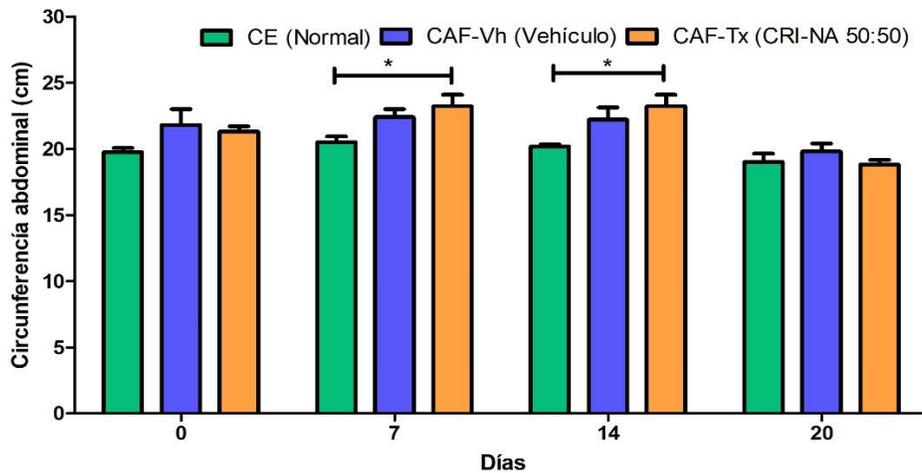
disminución comparado con el grupo CE, con 8% de aumento en el día 20 ($p < 0.001$). Además, el aumento del IMC del grupo CAF-Vh (16% en el día 20) con el grupo de CAF-Tx, fue diferente durante el tratamiento ($p < 0.001$).

Al no tener puntos de corte que estimen el grado de obesidad de las ratas durante el tratamiento, el IMC de los grupos CAF-Vh y CAF-Tx se vio afectado, indicando que el tratamiento con la mezcla crisina:naringenina (50:50) disminuye el IMC de las ratas alimentadas con dieta de cafetería.



Gráfica 16. IMC del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; *** $p < 0.001$ Vs CE; $\phi\phi\phi$ $p < 0.001$ vs. CAF-Vh.

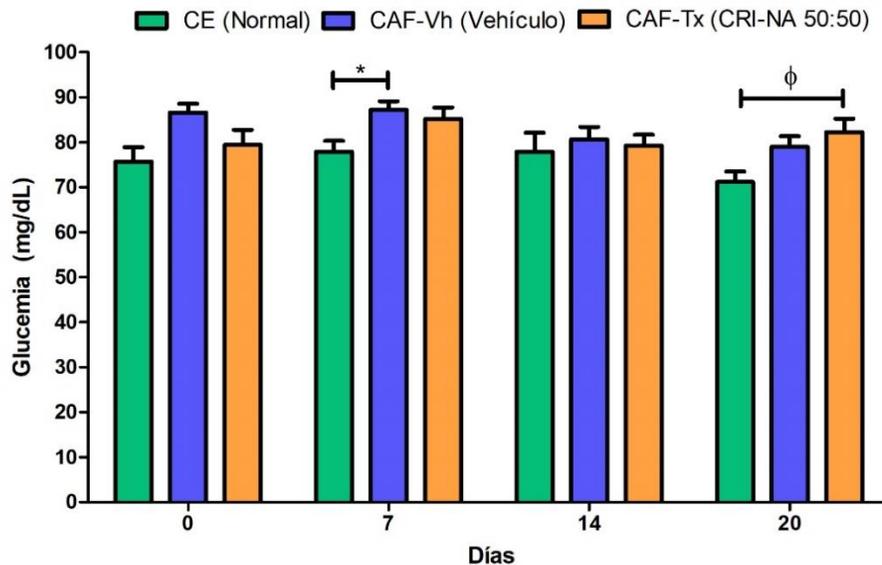
La gráfica 17 muestra la circunferencia abdominal durante el tratamiento de los tres grupos; en los días 7 y 14 los animales del grupo CAF-Vh y CAF-Tx aumentaron de su circunferencia abdominal, con respecto al grupo CE ($p < 0.05$). Como se observa en el día 20, en los animales del grupo CAF-Vh disminuyó la circunferencia abdominal, una posible causa puede ser la falta de sensibilidad a la insulina dentro del tejido adiposo visceral, incrementado la lipólisis y liberación incontrolada de ácidos grasos (Gutiérrez *et al.*, 2009). Por otro lado, el grupo CE mantuvo su circunferencia abdominal constante durante el tratamiento, mientras que el grupo CAF-Tx disminuyó su circunferencia, concordando con los resultados obtenidos (gráficas 12, 13 y 16) que demuestran que la mezcla crisina:naringenina disminuye la ganancia de peso y la acumulación de tejido adiposo visceral.



Gráfica 17. Circunferencia abdominal del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; * $p < 0.05$ vs. CE.

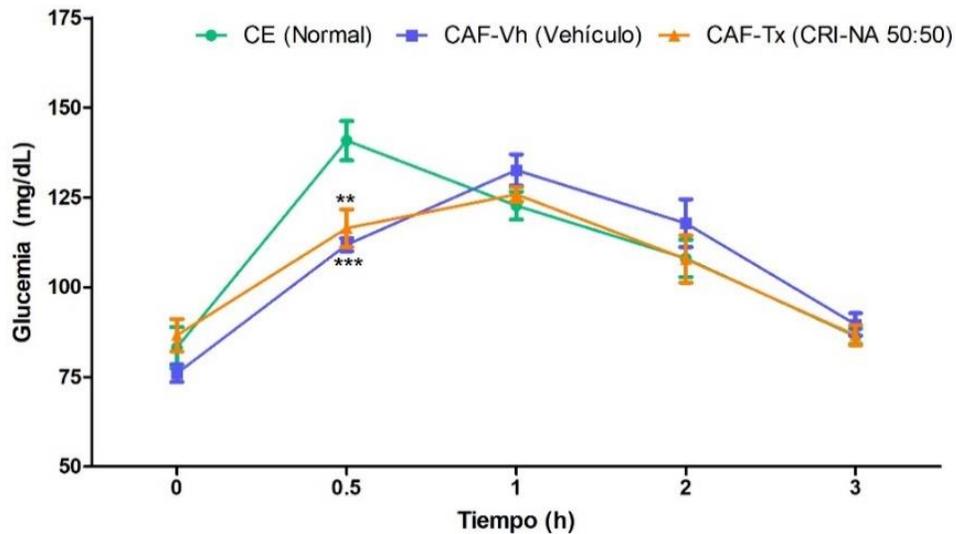
10.8. Efecto antihiper glucémico de la mezcla crisina:naringenina

La gráfica 18 describe muestra el monitoreo glucémico en ayunas durante los 20 días de tratamiento; estas tomas fueron con glucómetro Accu-Check Performa, en el día 7 hubo diferencia ($p < 0.05$) la glucemia del grupo CAF-Vh con respecto al grupo CE, y un ligero descenso de la glucemia en el grupo CAF-Tx. El día 14 no hubo cambios significativos de los grupos, pero en el día 20 el grupo CAF-Vh tuvo glucemia elevada, y el grupo CAF-Tx fue significativa ($p < 0.05$) en la glucemia comparados con el grupo CE. Con respecto a los grupos CAF-Vh y CAF-Tx, aumentó de la glucemia en el grupo CAF-Tx en comparación con el grupo CAF-Vh, distinto a lo reportado por Ramírez-Espinosa *et al.*, 2017 y Ortiz-Andrade *et al.*, 2008, del efecto antihiper glucémico y antidiabético de crisina y naringenina. Una posible causa de esta discrepancia es que al momento de tomar la muestra de sangre, los animales del grupo CAF-Tx tuvieron estrés, alterando los resultados. Para corroborar estos resultados, se cuantificó la glucosa por el método de con glucosa oxidasa (gráfica 22) al final del experimento, estos datos se discuten posteriormente.



Gráfica 18. Glucemia en ayunas del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; * $p < 0.05$ vs. CE; ϕ $p < 0.05$ vs. CAF-Vh.

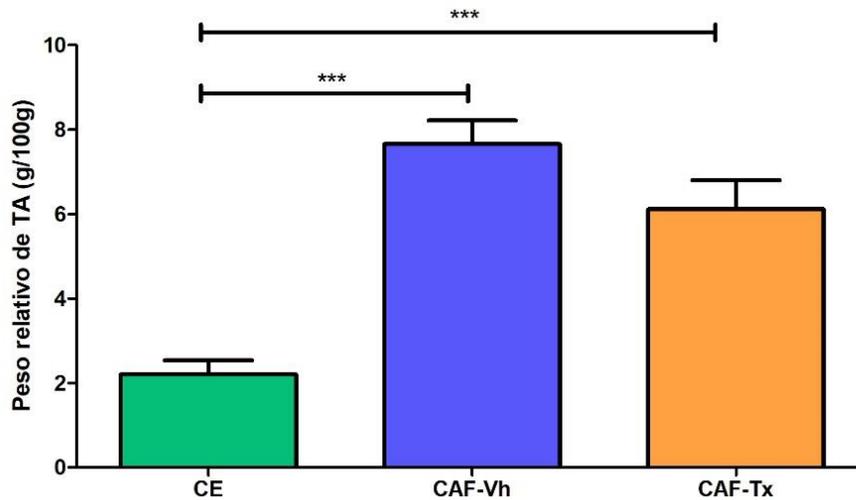
Para observar cambios en absorción y metabolismo de carbohidratos en ratas sometidas a una dieta de cafería y tratadas con la mezcla crisina:naringenina, se hizo CTG (gráfica 19). Por lo que se refiere a los grupo CAF-Vh y CAF-Tx con respecto al grupo CE, ambos alcanzaron su pico hiperglucémico a la 1 h de haber iniciado la curva, aunque el pico hiperglucémico del grupo CAF-Tx fue inferior al del grupo CAF-Vh, no hubo diferencia significativa. Este retraso del pico hiperglucémico por el grupo CAF-Vh, indica deterioro en la secreción y sensibilidad de la insulina, disminuyendo la captación de glucosa por las células blanco y por consiguiente, deterioro de las células β pancreáticas y resistencia a la insulina agravada (Wang *et al.*, 2018), o por aumento de grasa ectópica en hígado (esteatosis hepática) que contribuye al desarrollo de glucógeno hepático elevado, causado por disminución de la señalización de la insulina en hígado (Maeda Junio *et al.*, 2018). Además, el grupo CAF-Tx alcanzó valores idénticos de glucemia a los del grupo CE en las horas 2 y 3. Es probable que esta disminución de glucemia se deba a que crisina aumenta la translocación del transportador GLUT-4 (Satyanarayana *et al.*, 2015), activación del receptor PPAR- γ (El-Bassossy *et al.*, 2014), a su vez naringenina inhibe el transportador sodio-glucosa en el intestino (Li *et al.*, 2006) y la activación de AMPK (Nyane *et al.*, 2017), mejorando la glucemia en el grupo CAF-Tx.



Gráfica 19. Curva de tolerancia a la glucosa del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. CE. ABC para el grupo CE 456.3, CAF-Vh 445.0 y CAF-Tx 436.6

10.9. Peso relativo del tejido adiposo e hígado después del tratamiento

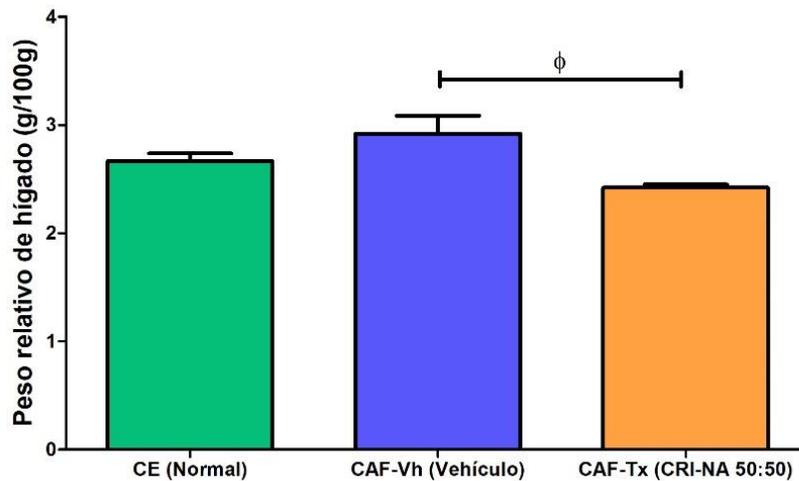
Al finalizar el tratamiento, las ratas se ayunaron 16 h y se anestesiaron para obtener el tejido adiposo (TA) y el hígado. Los resultados muestran el peso relativo del TA visceral (gráfica 20). Los animales del grupo CAF-Vh y CAF-Tx tuvieron diferencia con respecto al grupo CE ($p < 0.001$), de modo que la dieta de cafetería induce acumulación de TA (Sampey *et al.*, 2011). En contraste, el grupo CAF-TX disminuyó 19% con respecto al grupo CAF-Vh, indicando que la mezcla crisina:naringenina disminuye la acumulación de TA, ya conoce que crisina induce un cambio fenotípico de los adipocitos blancos (3T3-L1) a marrón, al expresar UCP-1, PGC- α y PRDM16, a través de la vía AMPK, y de la expresión de PRDM16 como ligando de los PPAR- γ , que induce el pardeamiento de los adipocitos (Choi *et al.*, 2016); en cuanto a naringenina, ha demostrado efectos antiadiposidad por la expresión de PPAR- α (Cho *et al.*, 2011).



Gráfica 20. Peso relativo de TA (tejido adiposo) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; *** $p < 0.001$ vs. CE.

Además, se determinó el peso relativo del hígado para cada grupo, los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre los grupos CAF-Vh y CAF-Tx con respecto al grupo CE, a pesar del 11.5% de aumento del peso del grupo CAF-Vh (gráfica 21). Sin embargo, el grupo CAF-Tx disminuyó 17.2% con respecto al CAF-Vh ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran que el consumo excesivo de dieta de cafetería aumentó el peso del hígado, ocasionado por la acumulación de lípidos en hígado y, como consecuencia, desarrollo de hígado graso (de Castro Ghizoni *et al.*, 2013; Maeda Júnior *et al.*, 2018).

En cuanto a crisina, se conoce su efecto hepatoprotector contra lesión hepática inducida por D-galactosamina (Pushpavalli *et al.*, 2010); por su parte, naringenina reduce la acumulación ectópica de lípidos en hígado, con expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos: CPT1 α , UCP2, ACOX1 y PPAR α (Ke *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2011; Huong *et al.*, 2006), además de la expresión SREBP1c que contribuye a la acumulación de lípidos hepáticos, y el tratamiento con naringenina disminuyó la expresión y la acumulación de lípidos (Mulvihill *et al.*, 2009).

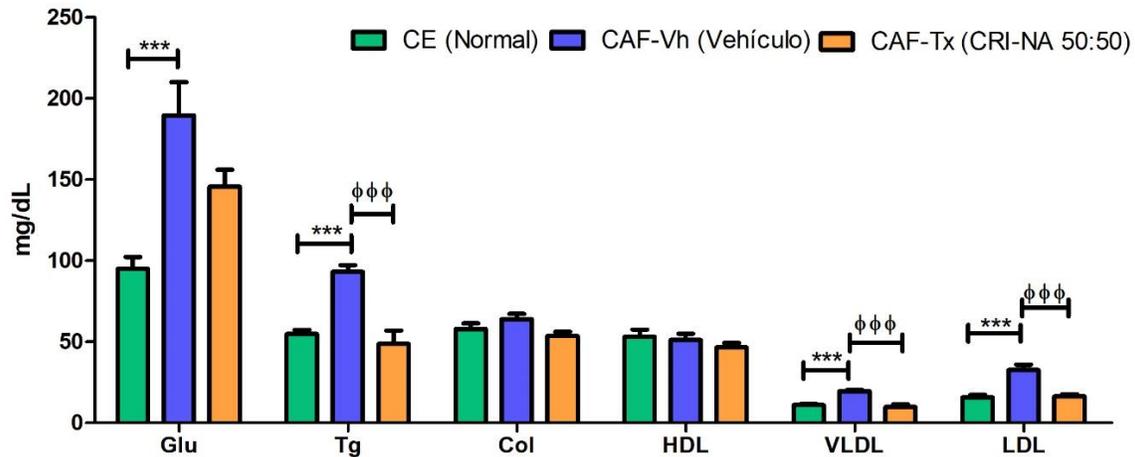


Gráfica 21. Peso relativo del hígado del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; * $p < 0.05$ Vs CE; ϕ $p < 0.05$ vs. CAF-Vh.

10.10. Perfil bioquímico (glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL, VLDL Y LDL)

Los resultados muestran que la mezcla crisina:naringenina (50:50) durante los 20 días la glucemia del grupo CAF-Vh aumentó ($p < 0.001$) con respecto al grupo CE; sin embargo, el grupo CAF-Tx también aumentó de la glucemia, pero al ser comparado con el grupo CAF-Vh esta disminuyó sin diferencia significativa (gráfica 22). En cuanto al perfil lipídico, los triglicéridos del grupo CAF-Vh aumentaron vs el grupo CE ($p < 0.001$), al comparar el grupo CAF-Tx con el grupo CE hubo valor idéntico de triglicéridos, pero disminuyeron con respecto al grupo CAF-Vh ($p < 0.001$). Por el contrario, no hubo cambios significativos en colesterol total y HDL. Por último, VLDL y LDL del grupo CAF-Vh aumentaron con respecto al grupo CE ($p < 0.001$), en cuanto al grupo CAF-Tx tuvo disminución comparada con el grupo CAF-Vh ($p < 0.001$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Satyanarayana *et al.*, 2015; Zarzecki *et al.*, 2014; Pushpavalli *et al.*, 2010; Ramírez-Espinosa *et al.*, 2018; Priscilla *et al.*, 2015; Ortiz-Andrade *et al.*, 2008; Borradaile *et al.*, 2003, quienes describieron que crisina o naringenina tienen efecto hipolipemiante al disminuir el colesterol total, los triglicéridos, ácidos grasos libres, LDL y VLDL; así como aumentar HDL, este efecto hipolipemiante se puede deber a la actividad de la HMG-CoA reductasa o a la actividad de lipoproteína lipasa y la inhibición de la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP).

En este contexto, nuestros datos sugieren que la mezcla crisina:naringenina (50:50) durante 20 días disminuye de manera importante, la glucemia, los Tg, VLDL y LDL, y podría ser un tratamiento para disminuir las dislipidemias, ocasionadas por la obesidad.



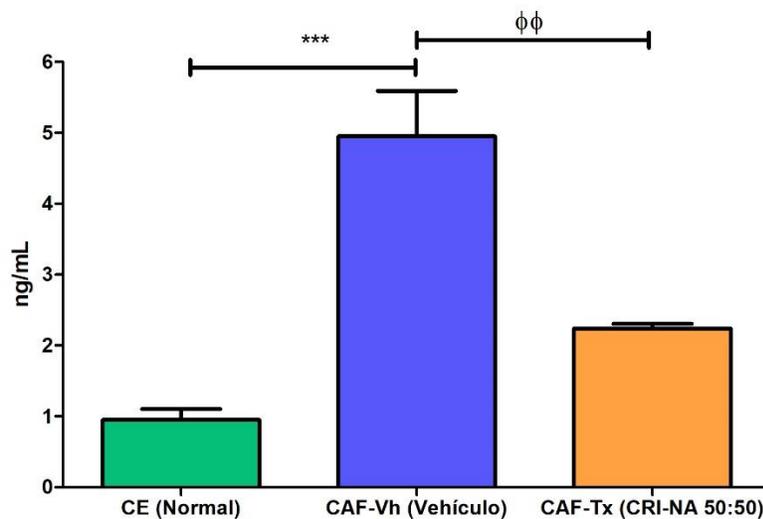
Gráfica 22. Perfiles bioquímicos: glucosa (Glu), triglicéridos (Tg), colesterol (Col), lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; *** $p < 0.001$ Vs CE $\phi\phi\phi$ $p < 0.001$ vs. CAF-Vh.

10.11. Insulinemia

Adicionalmente, se cuantificó la insulinemia en ayuno de los tres grupos, para relacionar el posible efecto farmacológico de la mezcla crisina:naringenina (50:50) en el proceso de resistencia a la insulina, ocasionado por la ingesta hipercalórica.

Los resultados mostraron que la CAF-Vh afecta la insulinemia, con incremento comparado con el grupo CE ($p < 0.001$); sin embargo, el grupo CAF-Tx disminuyó con respecto al grupo CAF-Vh ($p < 0.01$). Estos resultados concuerdan con los reportados por Sampey *et al.*, 2011 y Brandt *et al.*, 2010, quienes observaron que animales alimentados con dieta de cafetería tienen hiperglucemia e hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, con la prueba de tolerancia a la insulina, no está relacionada con defectos en la cascada de señalización de la insulina y de la expresión de AMPK, y de ser revertido por la actividad física; por lo tanto, podríamos considerar que los animales tuvieron resistencia a la insulina.

Por lo que se refiere a Satyanarayana *et al.*, 2015, observaron que ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa-sacarosa y tratadas con crisina, disminuyó la insulina, mejorando su señalización y la translocación del transportador GLUT-4, otros estudios revelan que la sensibilidad a la insulina se debe a la activación de los receptores PPAR- γ (El-Bassossy *et al.*, 2014), y la inhibición de 11 β -HSD1 (Torres-Piedra *et al.*, 2010). Por otro lado, Priscilla *et al.*, 2015 observaron que en ratas Wistar alimentadas con dieta alta en grasa-diabetizadas naringenina disminuyó la hiperinsulinemia y aumentó la expresión y la translocación de GLUT-4 y de regenerar la morfología de las células β pancreáticas; así mismo, la sensibilización a la insulina se podría deber a la inhibición de 11 β -HSD1 (Ortiz-Andrade *et al.*, 2008) y la activación de AMPK (Zygmunt *et al.*, 2010).



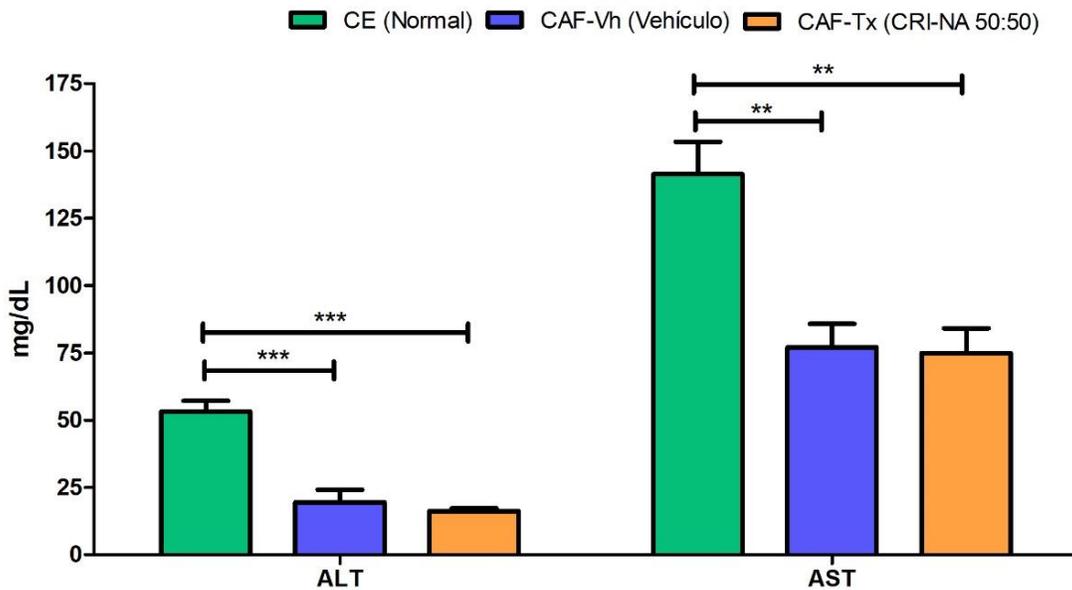
Gráfica 23. Niveles de insulina del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Cada grupo representa la media \pm S.E.M. $n = 5$ y $n = 4$; *** $p < 0.001$ Vs CE $\phi\phi$ $p < 0.01$ vs. CAF-Vh.

10.12. Perfil hepático, transaminasas (ALT y AST)

Las enzimas se encuentran en todos los tejidos y aparecen en el suero, como consecuencia de una lesión celular. Dentro de este grupo encontramos a las aminotransferasas (transaminasas), las cuales permiten evaluar el estado general del hígado. Para este estudio se determinaron las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), como biomarcadores empíricos para el diagnóstico. Las dos enzimas están ampliamente distribuidas en los tejidos, pero la ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito; mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el

corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos, por lo que un aumento de AST en el suero no es específico de un órgano concreto, pero indica daño tisular general (Marshall *et al.*, 2013).

Los valores revelan diferencia en ALT y AST entre el grupo CE con CAF-Vh y del grupo CE con CAF-Tx (gráfica 24). Por otra parte, esperábamos aumento de ALT y de AST en suero de animales que recibieron el vehículo (CAF-Vh) y disminución o normalización de esos valores en animales tratados con crisina:naringenina (50:50) (CAF-Tx), pero los resultados indican disminución en ambos grupos en comparación con el grupo CE ($p < 0.001$ y $p < 0.01$), siendo 63.3% CAF-Vh y 69.5% CAF-Tx (ALT) y 45.4% y 46.9% (AST) menores, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por *de Castro Ghizoni et al.*, 2013, donde observaron una disminución de los valores de ALT y AST en ratas Wistar con dieta de cafetería en comparación con los de dieta estándar. Los animales con dieta de cafería tuvieron hígado graso, reduciendo así su producción de glucosa a partir de glutamina y alanina, no ocasionada por alteración en la gluconeogénesis, sino por disminución enzimática para metabolizar los aminoácidos, esto se correlaciona con la disminución de algunas enzimas, como AST. Por otra parte, la desnutrición puede afectar el déficit de piridoxal-5'-fosfato (Wallach, 2003), coenzima en las reacciones de transaminación, *ergo*, los animales con dieta de cafetería no recibieron los nutrientes necesarios afectando así los valores de ALT y AST.

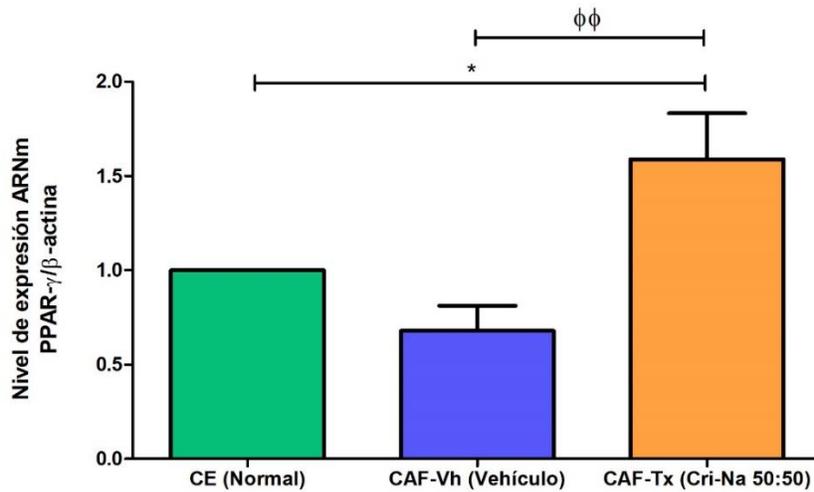


Gráfica 24. Perfiles hepáticos: alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. $n = 6$ y $n = 5$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. CE.

10.13. Expresión de genes por PCR-Tiempo real

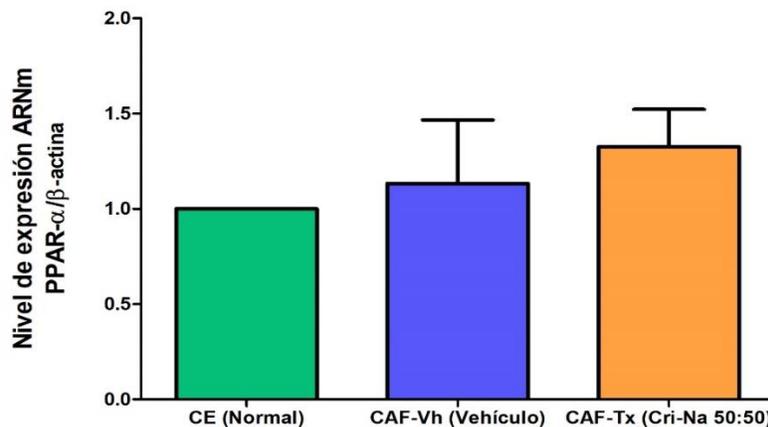
La PCR con transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR), es un método sensible, reproducible y preciso para determinar ARNm de citocinas en tejidos o células. El método se basa en la detección de una señal fluorescente producida y monitoreada durante el proceso de amplificación, sin la necesidad de procesamiento posterior a la PCR (Overbergh *et al.*, 2003).

Como se observa, los animales del grupo CAF-Vh disminuyeron la expresión de PPAR- γ , sin cambios significativos con respecto al grupo CE (gráfica 25). En cuanto al grupo CAF-Tx aumentó en comparación con el grupo CE ($p < 0.05$), así mismo aumentó comparando con el grupo CAF-Vh ($p < 0.001$), lo que indica que la expresión del gen PPAR- γ podría jugar un papel en la reducción de la glucemia durante el tratamiento con la mezcla crisina:naringenina. En cuanto a crisina existe evidencia que revela que la sensibilidad a la insulina es por activación de los receptores PPAR- γ (El-Bassossy *et al.*, 2014), así mismo naringenina mostró su expresión (Liu *et al.*, 2008), estos datos sugieren que la mezcla crisina:naringenina podría ser eficaz para el tratamiento de pacientes con diabetes, al mejorar la expresión en animales con hiperglucemia e hiperinsulinemia.



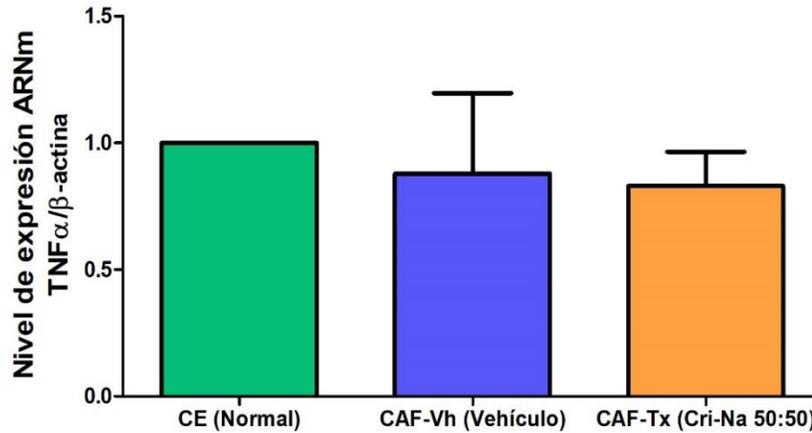
Gráfica 25. Análisis de RT-PCR de expresiones de PPAR- γ en tejido adiposo del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * P < 0.05 Vs CE $\phi\phi$ p < 0.01 vs. CAF-Vh.

Así mismo evaluamos la expresión del gen PPAR- α , que disminuyó en el grupo CAF-Vh comparado con el grupo CE, sin cambios; pero al compararlo con el grupo CAF-Tx hubo aumento sin cambios significativos. Por lo cual, PPAR- α podría estar actuando en TA, por lo que sería necesario aumentar el tiempo de tratamiento para observar posibles cambios en su expresión. Liu *et al.*, 2008 observaron que naringenina aumenta la expresión de PPAR- α .



Gráfica 26. Análisis de RT-PCR de expresiones de PPAR- α en tejido adiposo del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * P < 0.05 vs. CE.

Por último, medimos la expresión del gen TNF- α , citocina proinflamatoria, pero no cambió su expresión como lo reportaron Sampey *et al.*, 2011; quienes observaron aumento de TNF- α en tejido adiposo, por lo tanto creemos que es necesario aumentar el tiempo de dieta de cafetería para observar posibles cambios en la expresión de TNF- α .



Gráfica 27. Análisis de RT-PCR de expresiones de TNF- α en tejido adiposo del grupo CE, CAF-Vh y CAF-Tx de ratas Wistar macho tratadas durante 20 días. Los datos informados representan la media \pm S.E.M. n = 6 y n = 5; * P < 0.05 vs. CE.

10.14. Histopatología

Por último, hicimos cortes histológicos del hígado, para observar posibles cambios en su morfología. Se observan pequeños depósitos de grasa en los grupos CAF-Vh y CAF-Tx, indicando que el consumo de dieta de cafetería favorece estos depósitos de grasa y como posible factor para el desarrollo de hígado graso, el cual podría estar relacionado con la resistencia a la insulina y la hiperglucemia.

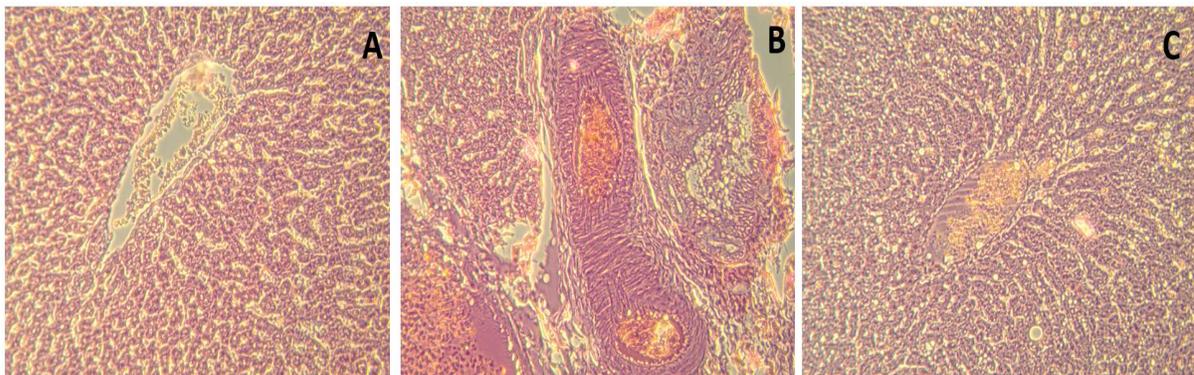


Figura 11. Cortes histológicos del hígado, A grupo CE, B grupo CAF-Vh y C grupo CAF-Tx.

11. CONCLUSIÓN

El consumo excesivo de alimentos con alto contenido calórico en el grupo CAF mostró ganancia de peso significativa, aumento del IMC y de la circunferencia abdominal; adicionalmente, los animales tuvieron hiperglucemia en ayunas, la cual se ve afectada a partir del día 30 de haber iniciado la dieta y manteniéndose así durante la dieta.

En cuanto al tratamiento con la mezcla crisina:naringenina, los animales tratados disminuyeron su peso corporal, así como en los parámetros somatométricos (IMC y de circunferencia abdominal significativamente; asimismo se afectaron los parámetros bioquímicos (glucosa, lípidos e insulina) y el peso relativo de órganos (tejido adiposo e hígado) al disminuir la acumulación de lípidos. Sin observar cambios en el consumo de alimentos.

Por lo tanto, la dieta de cafetería es un modelo de obesidad en rata, ya que se ven alteran los parámetros somatométricos y bioquímicos y podría ser utilizado como modelo para la evolución de nuevas biomoléculas con potencial efecto antiobesidad. En este contexto, el tratamiento con una la mezcla de crisina:naringenina (50:50), mostró efectos antiobesidad, insulino sensibilizador y de disminución de los parámetros bioquímicos, constituyéndola como posible tratamiento para la obesidad y sus alteraciones concomitantes.

12. PERSPECTIVAS

- Aumentar el tiempo de exposición de la dieta de cafetería y el consumo calórico en ratas Wistar.
- Realizar el monitoreo de los perfiles bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, VLDL, LDL y HDL), así como insulinemia y de resistencia a la insulina durante el monitoreo de la dieta de cafetería y el tratamiento con crisina:naringenina.
- Valorar los cambios de presión arterial en ratas Wistar alimentadas con dieta de cafetería y el tratamiento con crisina:naringenina
- Comparar la dieta de cafetería, la dieta alta en grasa y una dieta combinada (alta en carbohidratos y grasas) en ratas Wistar y ver el efecto del tratamiento con crisina:naringenina.
- Realizar los estudios de toxicidad aguda y subaguda de la mezcla crisina:naringenina.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Apostolopoulos V, de Courten MP, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2016 Jan; 60(1):43-57
- Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod Biomed Online*. 2015 Nov; 31(5):655-67.
- Borradaile NM, de Dreu LE, Barrett PH, Behrsin CD, Huff MW. Hepatocyte apoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. *Biochemistry*. 2003 Feb 11; 42(5):1283-91.
- Castro AM, Macedo-de la Concha LE, Pantoja-Meléndez CA. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. *Rev Med Hosp Gen Méx*. 2016. Jun; 80 (2): 101-105
- Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR, Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia*. 2012 Oct; 55(10):2583-92
- Cho KW, Kim YO, Andrade JE, Burgess JR, Kim YC. Dietary naringenin increases hepatic peroxisome proliferators-activated receptor α protein expression and decreases plasma triglyceride and adiposity in rats. *Eur J Nutr*. 2011 Mar; 50(2):81-8.
- Choi JH, Yun JW. Chrysin induces brown fat-like phenotype and enhances lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition*. 2016 Sep; 32(9):1002-10.
- Curti V, Di Lorenzo A, Rossi D, Martino E, Capelli E, Collina S, Daglia M. Enantioselective Modulatory Effects of Naringenin Enantiomers on the Expression Levels of miR-17-3p Involved in Endogenous Antioxidant Defenses. *Nutrients*. 2017 Feb 28; 9(3)
- Donath MY, Steven E. Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb; 11(2):98-107
- El-Bassossy, H.M.; Abo-Warda, S.M.; Fahmy, A. Chrysin and luteolin alleviate vascular complications associated with insulin resistance mainly through PPAR- γ activation. *Am. J. Chin. Med*. 2014, 42, 1153–1167
- El-Bassossy, H.M.; Abo-Warda, S.M.; Fahmy, A. Chrysin and luteolin alleviate vascular complications associated with insulin resistance mainly through PPAR- γ activation. *Am. J. Chin. Med*. 2014, 42, 1153 -1167

- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), Instituto Nacional de Salud Pública 2016. Fecha de consulta: 03 de Junio de 2017. Disponible en:
- Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Aug; 105(2):141-50.
- Faggio C, Sureda A, Morabito S, Sanches-Silva A, Mocan A, Nabavi SF, Nabavi SM. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *Eur J Pharmacol.* 2017 Jul 15; 807:91-101.
- Farkhondeh T, Abedi F, Samarghandian S. Chrysin attenuates inflammatory and metabolic disorder indices in aged male rat. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan; 109:1120-1125.
- Federación Internacional de la Diabetes (IDF). Síndrome metabólico. Fecha de consulta: 03 de Junio 2017. Disponible: <https://www.idf.org/e-library/consensusstatements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome>.
- Feng X, Qin H, Shi Q, Zhang Y, Zhou F, Wu H, Ding S, Niu Z, Lu Y, Shen P. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPAR γ . *Biochem Pharmacol.* 2014 Jun 15; 89(4):503-514.
- Fuentes-Debray S. (2016). Caracterización bioquímica y molecular de un modelo murino de obesidad basado en una dieta de cafetería. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos, México.
- Gao M, Ma Y, Liu D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. *PLoS One.* 2015 Mar 13; 10(3):e0119784.
- Grundy SM. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89 (6): 2595-2600.
- Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Jan; 1411(1):21-35.
- Hossain MK, Dayem AA, Han J, Yin Y, Kim K, Saha SK, Yang G, Choi HY, Cho S. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr; 17(4): 569.
- Huong DT, Takahashi Y, Ide T. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid oxidation in mice fed citrus flavonoids. *Nutrition.* 2006 May; 22(5):546-52.

- Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, V AK, Gogoi R, Barua CC .Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicol Lett.* 2015 Mar 4; 233 (2):214-25.
- Ke JY, Kliewer KL, Hamad EM, Cole RM, Powell KA, Andridge RR, Straka SR, Yee LD, Belury MA. The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutr Metab (Lond).* 2015 Jan 13; 12:1.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N Engl J Med* 2002; 346: 393-403.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* 2013: 1-1
- León-Pedroza JI, González-Tapia LA, del Olmo-Gil E, Castellanos-Rodríguez D, Escobedo G, González-Chávez A. Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: from the molecular evidence to the clinical practice [Article in Spanish]. *Cir Cir.* 2015 Nov-Dec; 83(6):543-51.
- Li M, Cheung BM. Pharmacotherapy for obesity. *Br J Clin Pharmacol.* 2009 Dec; 68(6):804-10.
- Mohamed GA, Ibrahim SRM, Elkhayat ES, El Dine RS. Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* (2014) 52, 269-284.
- Mohamed GA, Sabrin RM, Elkhayat ES, Salah R. Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* (2014) Jun; 52, 269–284
- Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie.* 2016 Jun; 125:259-66.
- Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol.* 2014 Sep; 222(3):R113-27.
- Mulvihill EE, Allister EM, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Edwards JY, Markle JM, Hegele RA, Huff MW. Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2009 Oct; 58(10):2198-210.
- Nakajima VM, Macedo GA, Macedo JA. Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *J Food Sci Technol.* 2014 Dec (59), 1205-1212
- NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.

- Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DH, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Nascimento AF, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* 2010 Jul; 16(7):208-217
- Organización Mundial de la Salud. Obesidad. Fecha de consulta: 25 de Abril de 2017. Disponible en: www.who.int/es
- Pitsavos C, Panagiotakos D, Weinem M, Stefanadis C. Diet, Exercise and the Metabolic Syndrome. *Rev Diabet Stud.* 2006 Fall; 3(3):118-126
- Prevención, diagnóstico y Tratamiento del Sobrepeso y la Obesidad Exógena. México, Secretaria de Salud. Consultado 02 de Junio de 2017. Disponible: <http://www.cenetec.salud.gob.mx>
- Pushpavalli G, Kalaiarasi P, Veeramani C, Pugalendi KV. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2010 Apr 10; 631(1-3):36-41.
- Pushpavalli G, Veeramani C, Pugalendi KV. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D-galactosamine-induced hepatotoxicity rats. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jun; 48(6):1654-9.
- Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2017 Aug; 11(8):215-225.
- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Jun; 19 (6):1109-1117
- Satyanarayana K, Sravanthi K, Shaker IA, Ponnulakshmi R, Selvaraj J. Role of chrysin on expression of insulin signaling molecules. *J Ayurveda Integr Med.* 2015 Oct-Dec; 6(4):248-58.
- Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite.* 2009 Feb; 52(1):34-8.
- Sharabi K, Tavares CD, Rines AK, Puigserver P. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med.* 2015 Dec; 46:21-33.
- Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjöström L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an

adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*. 2004 Jan; 27(1):155-61.

- Torres-Piedra, M.; Ortiz-Andrade, R.; Villalobos-Molina, R.; Singh, N.; Medina-Franco, J.L.; Webster, S.P.; Binnie, M.; Navarrete-Vázquez, Ç.; Estrada-Soto, S. A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 2606–2612
- Wallach J. (2003). Parámetros sanguíneos básicos: Alteraciones debidas a enfermedades. En *Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio* (pp. 43-50). Barcelona (España): MASSON, S.A.
- Wang X, Zhao X, Zhou R, Gu Y, Zhu X, Tang Z, Yuan X, Chen W, Zhang R, Qian C, Cui S. Delay in glucose peak time during the oral glucose tolerance test as an indicator of insulin resistance and insulin secretion in type 2 diabetes patients. *J Diabetes Investig.* 2018 Nov; 9(6):1288-1295.
- Yoshida H, Watanabe W, Oomagari H, Tsuruta E, Shida M, Kurokawa M. Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2013 Jul; 24(7):1276-84
- Zarzecki MS, Araujo SM, Bortolotto VC, de Paula MT, Jesse CR, Prigol M. Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicol Rep.* 2014 May 12; 1: 200-208.
- Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res.* 2015 Jul; 64 (7):501-12
- Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res.* 2015 Jul; 64(7):501-12.
- Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech.* 2003 Mar; 14(1):33-43.
- Veerappan R, Malarvili T, Archunan G. Effects on chrysin on lipid and xenobiotic metabolizing enzymes in I-NAME–induced hypertension. *Int J of Nutr, Pharm Neu Dis.* 2014 Dec; 4: S17-S22.

- Karima N, Jiach Z, Zhenga X, Cuib S, Chen W. A recent review of citrus flavanone naringenin on metabolic diseases and its potential sources for high yield-production. *Trends in Food Science & Technology* 79 (2018) 35-54.
- Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother Res.* 2008 Oct; 22(10):1400-3.

CONSTANCIAS





CERTIFICATE OF RECOGNITION FIRST PLACE

THIS CERTIFICATE IS PROUDLY PRESENTED TO

Hugo Ulises Ocampo Montalban

in recognition of their outstanding performance in the Research Presentation Competition held during the 12th IPSF Pan American Regional Symposium in Trujillo, Peru in July 2018

MATTHEW HUNG
Chairperson of the
IPSF Pan American
Regional Office 2017-18

YOEL ALCÁNTARA GUTIÉRREZ
Chairperson of the
12th IPSF Pan American
Regional Symposium 2018

FLOR ASMAT SIGÜENÁS
Academic Coordinator of the
12th IPSF Pan American
Regional Symposium 2018



FEFARMEX

La Federación Farmacéutica Mexicana, así como la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a través de la Facultad de Ciencias Químicas otorga la presente :



CONSTANCIA

A: OCAMPO MONTALBAN HUGO ULISES

Por su participación en la Exposición de Carreles con el tema:

Evaluación de la mezcla Crisina-naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería

Durante las actividades del Tercer Simposio Nacional para la Integración farmacéutica "Uniendo el laboratorio industria y servicios farmacéuticos"

H. Puebla de Z., a 8 de noviembre de 2018

Dr. Jorge Raul Cerna Cortés
Director de la Facultad de Ciencias Químicas



Dr. Manuel Alfonso Ramos Del Carmen
Director del Simposio Nacional Farmacéutico

L.F. Harim Ernesto González Pech
Presidente de la Federación Farmacéutica Mexicana.



La Federación Farmacéutica Mexicana, así como la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla a través de la Facultad de Ciencias Químicas otorga la presente:



CONSTANCIA

A: Hugo Ulises Ocampo Montalban



Por su **ASISTENCIA** al Tercer Simposio Nacional para la Integración Farmacéutica
"Uniendo el laboratorio, industria y servicios farmacéuticos"

Realizado del 6 al 8 de noviembre de 2018

Con una duración de 15 horas

H. Puebla de Z., a 8 de noviembre de 2018

D.C. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director de la Facultad





FACULTAD DE FARMACIA
POSGRADO EN FARMACIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

A través de la Facultad de Farmacia

OTORGA EL PRESENTE:

RECONOCIMIENTO

A: Hugo Ulises Ocampo Montalban

Por haber asistido la conferencia "LA ALTERNATIVA AL DESARROLLO DE INDUSTRIAS FARMOQUÍMICAS DE GENÉRICOS SON LAS INDUSTRIAS DE INNOVACIÓN" impartido por el Dr. Francisco Lara Ochoa con un total de dos horas el día 14 de junio de 2018 en el auditorio "Dra. Carmen Giral Barnés" de la Facultad de Farmacia de la UAEM.

"Por una humanidad culta"
Cuernavaca, Morelos a 14 de junio de 2018.

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director.



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificios 30 y 61,
Tel. (777) 329 7000 Ext. 3368 / reynas@uaem.mx

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2021



Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Escuela de Técnicos Laboratoristas

Otorga el presente:

Reconocimiento

Al: L. F. Hugo Ulises Ocampo Montalban

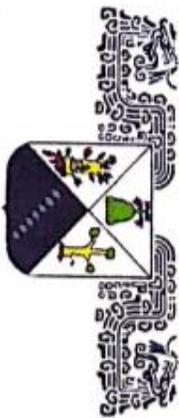
Por su exposición a los alumnos de la carrera de Industrial Farmacéutico sobre la "Determinación del efecto antidiabético de la mezcla de crisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería", con una duración de 6 hrs.

Cuernavaca, Mor., a 15 de noviembre del 2018

"Por una Humanidad Culta"

M. en E. C. Angélica del Carmen Arellano Franco
Secretaría de Docencia de la Escuela

Dr. Jorge Armando Peralta Sámano
Director de la Escuela



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS
A través de la Facultad de Farmacia

Hace constar que el:



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

L.F. HUGO ULISES OCCAMPO MONTALBAN

Participó en el ciclo de seminarios de la Facultad de Farmacia con
la ponencia:

" Determinación del efecto antidiabético de la mezcla crisina y
naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería. "

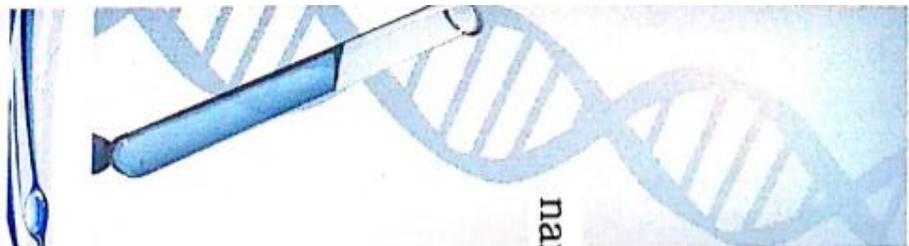
Cuernavaca, Morelos a 05 de marzo de 2018.

Dr. Elyen Hernández Baltazar

Director de la Facultad de Farmacia



Facultad
de Farmacia
POSGRADO





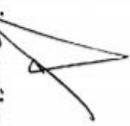
La Asociación Mexicana para el Estudio Multidisciplinario del Síndrome Metabólico A.C. (AMESI) y el Colegio de Medicina Interna de México A.C. (CMIM) otorgan la presente:

constancia

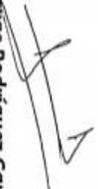
a: **L.F. HUGO ULISES OCAMPO MONTALBAN**

como: **ASISTENTE AL CICLO DE CONFERENCIAS**

Durante la **10a Conferencia Científica Anual sobre Síndrome Metabólico** realizada del 09 al 11 de agosto de 2018 en la Ciudad de México, D.F.


Dr. Antonio González Chávez
Presidente AMESI
Profesor titular


Dra. Sandra Elizondo Argueta
Profesor Adjunto


Dr. Jorge Rodríguez García
Presidente Colegio de Medicina
Interna de México A.C.





El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

y la Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Otorgan la presente

CONSTANCIA

a: LF Hugo Ulises Ocampo Montalban

Por su participación como ASISTENTE en el:

“XXVI Congreso Nacional de Educación Química Farmacéutica Biológica
y XXII Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia”.

Duración: 23 horas.

Cuernavaca, Morelos, a 07, 08 y 09 de febrero de 2018.


DESS Rodolfo Cruz Rodriguez
Presidente del Colegio Nacional de
Químicos Farmacéuticos Biólogos
México, A.C.


M. en C. Kenneth Rubio Carrasco
Presidenta de la Comisión de Reunión
Nacional de Estudiantes de Farmacia del
CNQFBM, A.C.


Dra. María Estela Meléndez Camargo
Presidenta de la Comisión de Educación
del CNQFBM, A.C.


Dr. Efrén Hernández Baltazar
Director de la Facultad de Farmacia de la
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Otorgan la presente

CONSTANCIA

a: **L.F. Hugo Ulises Ocampo Montalbán**

por su participación como asistente al

**Coloquio en Innovaciones Químicas y Fronteras Farmacéuticas:
De las Moléculas y los Materiales a los Medicamentos
(CIQ&FF:3M)**

Celebrado en Cuernavaca Morelos, a 8 de mayo del 2018

Dr. Hugo Morales Rojas

Director de Desarrollo de la Investigación y Creación Artística
Secretaría Académica-UAEM

Todos juntos por



CONACT

Financiado por CB 2013 -221455



VOTOS



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: L.F. Ocampo Montalban Hugo Ulises.

Título de la tesis: Determinación del efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.

Grado a obtener

- Maestría en farmacia
 Doctorado en farmacia

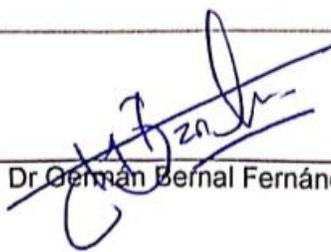
Miembro del jurado: Dr Germán Bernal Fernández.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Dr. Germán Bernal Fernández

28 de mayo del 2019



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: L.F. Ocampo Montalban Hugo Ulises.

Título de la tesis: Determinación del efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.

Grado a obtener

- Maestría en farmacia
 Doctorado en farmacia

Miembro del jurado: Dr Cairo David Toledano Jaimes.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr Cairo David Toledano Jaimes

24 de mayo del 2019



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: L.F. Ocampo Montalban Hugo Ulises.

Título de la tesis: Determinación del efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.

Grado a obtener

- Maestría en farmacia
 Doctorado en farmacia

Miembro del jurado: Dr Rafael Villalobos Molina.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Rafael Villalobos Molina
Dr Rafael Villalobos Molina

16 de mayo del 2019



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: L.F. Ocampo Montalban Hugo Ulises.

Título de la tesis: Determinación del efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.

Grado a obtener

- Maestría en farmacia
 Doctorado en farmacia

Miembro del jurado: Dr Juan Gabriel Navarrete Vásquez.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):


Dr. Juan Gabriel Navarrete
Vásquez

16 de mayo del 2019



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: L.F. Ocampo Montalban Hugo Ulises.

Título de la tesis: Determinación del efecto antiobesidad e insulino sensibilizador y su relación con los parámetros bioquímicos e inflamatorios de la mezcla crisina y naringenina en un modelo murino de obesidad con dieta de cafetería.

Grado a obtener

- Maestría en farmacia
 Doctorado en farmacia

Miembro del jurado: Dr Julio Cesar Almanza Pérez.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal y como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dr Julio Cesar Almanza Pérez

16 de mayo del 2019