



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS**  
**QUÍMICAS**

“ESTUDIO QUÍMICO Y VALORACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE  
*Hypericum silenoides* Juss. E *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht.  
PARA EL CONTROL DEL SOBREPESO EN MODELOS  
*IN VIVO* E *IN VITRO*”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. LETICIA GARCÍA DE LA CRUZ

TUTOR  
DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. RICARDO REYES CHILPA, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.  
DR. ENRIQUE HONG CHONG, CINVESTAV, IPN.

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **SÍNODO**

**Presidente:** Dr. Alfredo Ortega Hernández.  
**Vocal:** Dr. Manuel Jiménez Estrada.  
**Vocal:** Dra. Rachel Mata Essayag.  
**Vocal:** Dr. Enrique Hong Chong.  
**Secretario:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents.

### **Sitio donde se desarrolló el trabajo:**

Laboratorio 126 del conjunto "E".  
Departamento de Farmacia  
Facultad de Química. UNAM.

**Asesor:** Dr. Andrés Navarrete Castro.

**Sustentante:** M. en C. Leticia García de la Cruz.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por su apoyo y asesoramiento en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado. Registro Número 170421/170421.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP) por medio del proyecto 6390-18 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con el proyecto IN201506.

A los Honorables Miembros del Jurado por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas sugerencias.

## **PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.**

- 1. Leticia García-de la Cruz**, Yareth Galvan-Goiz, Sergio Caballero-Caballero, Sergio Zamudio and Andrés Navarrete (2013). *Hypericum silenoides* Juss. and *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht. extracts: in-vivo hypolipidaemic and weight-reducing effects in obese rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 65(4):591-603.
- 2. Leticia García-de la Cruz**, Sergio Zamudio and Andrés Navarrete. (2012). Hypolipidemic and weight reducing activity of two *Hypericum* species extracts in cafeteria fed overweight rats. *Planta Medica*; 78(11)-PH6. DOI: 10.1055/s-0032-1320665
- 3. Leticia García-de la Cruz**, Sergio Caballero-Caballero, Sergio Zamudio, Georgina. Duarte-Lisci and Andrés Navarrete-Castro (2013). Essential oil composition of *Hypericum silenoides* Juss and *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht from central México” *Journal of Essential Oil Bearing Plants*”. (Aceptado).
- 4. Leticia García-de la Cruz** and Andrés Navarrete (2013). Sibutramine administration decreases serum glucose, HDL and triglycerides levels in obese rats induced by a Mexican-Cafeteria Diet. Para ser enviado al Drug Development Research
- 5. Leticia García-de la Cruz**, Víctor Ilán Tapia-Berrón, Georgina Duarte-Lisci and Andrés (2013). Differential fatty acid profile in adipose and non-adipose tissues in obese rats fed a cafeteria diet treated with *Hypericum silenoides* Juss. aqueous extract. Para ser enviado a *Lipids*.

## CONGRESOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**1. Hypolipidemic and weight reducing activity of two *Hypericum* species extracts in cafeteria fed overweight rats.** Leticia García-de la Cruz, Sergio Zamudio and Andrés Navarrete. Modalidad Poster en el International Congress on Natural Products Research: New York City, New York, USA. July 30, 2012.

**2. Hypolipidemic and weight reducing activity of two *Hypericum* species extracts in cafeteria fed overweight rats.** Leticia García-de la Cruz and Andrés Navarrete. QuimiUnam 2012.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>I FUNDAMENTO TEÓRICO.</b> .....	<b>2</b>
1. OBESIDAD. ....	2
1.1. <i>Definición y clasificación.</i> .....	2
1.2 <i>Contexto global de la obesidad.</i> .....	3
1.3 <i>Cambios en la prevalencia de la obesidad en México.</i> .....	3
1.4 <i>Etiología de la obesidad.</i> .....	3
1.5 <i>Comorbilidades asociadas con la obesidad.</i> .....	4
2. TEJIDO ADIPOSO. ....	5
2.1 <i>Tejido adiposo y sus particularidades.</i> .....	5
2.2 <i>Tejido adiposo blanco (TAB).</i> .....	5
2.3 <i>Tejido adiposo pardo (TAP).</i> .....	6
3. MODELOS ANIMALES Y EXPERIMENTALES DE OBESIDAD. ....	6
3.1 <i>Clasificación.</i> .....	6
3.2 <i>Modelos neuroendocrinos.</i> .....	7
3 <i>Modelos genéticos.</i> .....	7
3.3.1 <i>Ratón obeso (ob/ob) y ratón diabético (db/db).</i> .....	7
3.3.2 <i>Rata Zucker genéticamente obesa (fa/fa).</i> .....	8
3.4 <i>Modelos dietéticos.</i> .....	9
3.4.1 <i>Dieta con alto contenido de grasas.</i> .....	9
3.4.2 <i>Dieta con alto contenido de carbohidratos.</i> .....	9
3.4.3 <i>Dieta de cafetería o dieta de supermercado.</i> .....	9
4. TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD.....	10
4.1 <i>Tratamiento quirúrgico.</i> .....	10
4.2 <i>Tratamiento farmacológico.</i> .....	11
4.2.1 <i>Sibutramina.</i> .....	11
4.2.2 <i>Orlistat.</i> .....	12
4.2.3 <i>Lorcaserina.</i> .....	13
4.3 <i>Uso de las plantas medicinales.</i> .....	13
5 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DEL GÉNERO <i>HYPERICUM.</i> .....	15
5.1 <i>Composición química del género Hypericum.</i> .....	15
5.2 <i>Composición química del aceite esencial del género Hypericum.</i> .....	18
5.3 <i>Actividad biológica del género Hypericum.</i> .....	19
5.4 <i>El género Hypericum en México.</i> .....	20
5.5 <i>Hypericum silenoides Juss.</i> .....	20
5.6 <i>Hypericum philonotis Cham. &amp; Schlecht.</i> .....	22
<b>II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>23</b>
<b>III HIPÓTESIS.</b> .....	<b>24</b>
<b>IV OBJETIVOS.</b> .....	<b>25</b>
4.1 <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	25
4.2 <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.</b> .....	<b>26</b>
5.1 <b>MATERIAL VEGETAL</b> .....	26

5.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS .....	26
5.2.1 Extractos orgánicos.....	26
5.2.2. Extracto acuoso.....	26
5.3 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	26
5.4 ANIMALES.....	26
5.5 FÁRMACOS Y SUSTANCIAS.....	27
5.6 EXTRACCIÓN DEL ORLISTAT.....	27
5.7 ENSAYOS IN VIVO.....	28
5.7.1 Modelo animal de obesidad.....	28
5.7.2 Componentes de las dietas.....	28
5.7.3 Evaluación del consumo de alimento.....	29
5.7.4 Administración de tratamientos.....	29
5.7.5 Evaluación de los extractos de <i>Hypericum</i> sobre el peso corporal y consumo de alimento.....	29
5.7.6 Evaluación del efecto antidepresivo de los extractos de <i>Hypericum</i> .....	30
5.7.7 Evaluación del efecto hipolipidémico e hipoglucemiante de los extractos de <i>Hypericum</i> .....	30
5.7.8 Evaluación de los extractos de <i>Hypericum</i> sobre tejido adiposo y no adiposo.....	31
5.7.9 Identificación de ácidos grasos por CG-EM.....	31
5.7.10 Efecto de <i>H. silenoides</i> sobre adipocitos blancos y pardos.....	32
5.8 ENSAYO <i>IN VITRO</i> . EFECTO DE <i>HYPERICUM</i> SOBRE LA INHIBICIÓN DE LIPASA PANCREÁTICA PORCINA.....	33
5.9 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE <i>H. SILENOIDES</i> E <i>H. PHILONOTIS</i> EMPLEANDO HPLC.....	33
5.10 EVALUACIÓN DE LA QUERCETINA, ÁCIDO CLOROGÉNICO Y RUTINA EN EL MODELO <i>IN VITRO</i> .....	35
5.11 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL.....	35
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
7.1 ENSAYOS IN VIVO.....	36
7.1.1 Modelo de obesidad.....	36
7.1.2 Efecto de los extractos de <i>Hypericum</i> sobre el peso corporal y el consumo de alimento.....	39
7.1.3 Efecto antidepresivo de los extractos de <i>Hypericum</i> .....	44
7.1.4 Efecto hipolipidémico e hipoglucemiante de los extractos de <i>Hypericum</i> .....	45
7.1.5 Efecto de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> sobre tejido adiposo y no adiposo.....	48
7.1.6 Análisis de la composición química de tejido adiposo y no adiposo por CG-EM.....	52
7.1.7 Efecto de <i>H. silenoides</i> sobre adipocitos blancos y pardos.....	54
7.2 ENSAYO <i>IN VITRO</i> .....	57
7.2.1 Efecto de <i>Hypericum</i> sobre la inhibición de la lipasa pancreática porcina.....	57
7.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE <i>H. SILENOIDES</i> E <i>H. PHILONOTIS</i> POR HPLC.....	61
7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LIPASAS <i>IN VITRO</i> DE LA QUERCETINA, ÁCIDO CLOROGÉNICO Y RUTINA.....	62
7.5 RENDIMIENTO DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES.....	63
7.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>H. SILENOIDES</i> E <i>H. PHILONOTIS</i> .....	63
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>65</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>XI. BIBIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO 1 APROBACIÓN DEL PROTOCOLO.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 2 IDENTIFICACION DEL ORLISTAT.....</b>	<b>89</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto antiobesidad de *Hypericum silenoides* Juss. e *H. philonotis* Cham. & Schlecht. en un modelo de obesidad dietético en ratas machos Wistar. Las ratas se alimentaron con una dieta de cafetería (hipercalórica, hiperglucídica e hiperlipidémica). La dieta incluyó alimentos mexicanos y se administró durante 77 días. Diferentes extractos de las dos especies de *Hypericum* fueron administrados a las dosis de 10, 30 ó 100 mg/kg durante 35 días. El efecto de ambas plantas sobre el peso corporal, consumo de alimentos y diversos parámetros bioquímicos como lo son la glucosa, perfil lipídico, alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST) e índice aterogénico (IA) se midieron. Adicionalmente el modelo *in vitro* de inhibición de la lipasa pancreática porcina y el modelo *in vivo* de nado forzado se desarrollaron. Los extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis* disminuyeron la glucosa y la ganancia de peso corporal en ratas macho Wistar con obesidad tipo 1. El extracto acuoso de *H. silenoides* mostró efecto antiobesidad a través de diferentes mecanismos farmacológicos que incluyeron efecto antihiperglucémico, anoréxico, antidepresivo, termogénico e hipolipidémico. Los niveles de colesterol, triglicéridos y HDL disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ), mientras que las LDL, índice aterogénico, AST y ALT no se alteraron. Por otro lado el extracto diclorometánico de *H. silenoides* ( $CI_{50} = 262.79 \pm 0.09$   $\mu\text{g/mL}$ ) y hexánico de *H. philonotis* ( $CI_{50} = 162.60 \pm 0.02$   $\mu\text{g/mL}$ ) mostraron actividad inhibitoria de la lipasa pancreática.

Adicionalmente los compuestos identificados en el extracto acuoso de *H. silenoides* e *H. philonotis* fueron la hiperforina, rutina, ácido clorogénico y quercetina. Los últimos tres compuestos no inhibieron la actividad de la lipasa pancreática porcina. Por otro lado se encontró que los compuestos más abundantes del aceite esencial de *H. silenoides* fueron *n*-nonano (11.8%), 1-tridecanol (11.6%) y *n*-dodecanal (10.5%). En contraste, los compuestos mayoritarios detectados en *H. philonotis* fueron 2-metil octano (52.7%), *n*-nonano (35.9%) y  $\beta$ -pineno (3.5%).

Es importante destacar que este trabajo es el primer estudio científico en donde se reporta la actividad antiobesidad de *H. silenoides* e *H. philonotis*.

## ABSTRACT

This study was carried out to assess the anti-obesity effect of *Hypericum silenoides* Juss and *H. philonotis* Cham. & Schlecht. in male Wistar rats fed with a cafeteria diet. Adult male Wistar rats with an initial body weight of 290–320 g were used in this trial. The rats were fed with a cafeteria diet (hypercaloric, hyperglycaemic and hyperlipidic). It included a variety of Mexican foods and was administered during 77 days. *Hypericum* species were administered orally at doses of 10, 30 or 100 mg/kg of body weight daily for 35 days. Body weight, food intake, anorexic effect and various biochemical parameters, such as serum glucose, lipid profile, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and atherogenic index (AI), were assessed. Additionally, inhibitory lipase activity assay and forced swimming test were also carried out

Oral administration of *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts resulted in a significant decrease in body weight and serum glucose levels in an animal model for Type 1 obesity. Treatment with aqueous extract of *H. silenoides* showed many potentials anti-obesity mechanisms, including anti-hyperglycemic effects, anorexic, antidepressant, thermogenesis stimulation and also significantly decreased total cholesterol, triglycerides and high-density lipoprotein-cholesterol ( $p < 0.05$ ) while low-density lipoprotein-cholesterol, AI, AST and ALT were not changed. The dichloromethane extract of *H. silenoides* (half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) =  $262.79 \pm 0.09$   $\mu\text{g/mL}$ ) and hexane extract of *H. philonotis* ( $IC_{50}$  =  $162.60 \pm 0.02$   $\mu\text{g/mL}$ ) showed the most potent lipase inhibitory activity.

On the other hand hyperforin, rutin, chlorogenic acid and quercetin were identified in the aqueous extract from *H. silenoides* and *H. philonotis*. The three last compounds did not show pancreatic lipase inhibition. The most abundant volatiles in the essential oil of *H. silenoides* were *n*-nonane (11.8%), 1-tridecanol (11.6%) and *n*-dodecanal (10.5%). In contrast, the essential oil composition of *H. philonotis* showed 2-methyl-octane (52.7%), *n*-nonane (35.9%) and  $\beta$ -pinene (3.5%) as the major constituents.

Finally, this trial provides the first scientific basis to support the use of *H. silenoides* and *H. philonotis* in anti-obesity treatments.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALT:** Alanina Transaminasa

**AST:** Aspartato Transaminasa

**CCK:** Colecistoquinina.

**CG-EM:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**CI<sub>50</sub>:** Concentración Inhibitoria cincuenta.

**COFEPRIS:** Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

**DL<sub>50</sub>:** Dosis Letal 50.

**EEM:** Error Estándar Medio.

**ENEC 1993:** Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas 1993.

**ENSA 2000:** Encuesta Nacional de Salud 2000.

**ENSANUT 2012:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012.

**FDA:** Agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos.

**GABA:** Ácido gamma-aminobutírico.

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad.

**IA:** Índice aterogénico

**IL-6:** Interleucina-6.

**IMC:** Índice de masa corporal.

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.

**LPL:** Lipoproteinlipasa.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**RI:** Índice de Kovats.

**TA:** Tejido adiposo.

**TAB:** Tejido adiposo blanco.

**TAP:** Tejido adiposo pardo.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ .

**TRG:** Triglicéridos.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de la obesidad y riesgo de enfermedad asociada.....	02
<b>Cuadro 2.</b> Modelos animales y experimentales de obesidad.....	07
<b>Cuadro 3.</b> Medicamentos antiobesidad en estudios clínicos.....	11
<b>Cuadro 4.</b> Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento para la obesidad .....	14
<b>Cuadro 5.</b> Compuestos presentes en el género <i>Hypericum</i> .....	16
<b>Cuadro 6.</b> Componentes químicos del aceite esencial del género <i>Hypericum</i> .....	18
<b>Cuadro 7.</b> Contenido energético y composición de la dieta de cafetería.....	28
<b>Cuadro 8.</b> Asignación azarosa de los animales de experimentación.....	30
<b>Cuadro 9.</b> Gradiente de elución programado para el análisis de HPLC.....	34
<b>Cuadro 10.</b> Peso corporal, ganancia de peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia en ratas macho Wistar alimentadas con dieta de cafetería o dieta balanceada.....	37
<b>Cuadro 11.</b> Efecto anoréxico de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> .....	43
<b>Cuadro 12.</b> Efecto antidepresivo de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> en el modelo de nado forzado...	44
<b>Cuadro 13.</b> Valores de la química sanguínea en ratas macho Wistar tratados con <i>H. silenoides</i> ...	46
<b>Cuadro 14.</b> Valores de la química sanguínea en ratas macho Wistar tratados con <i>H. philonotis</i> ...	47
<b>Cuadro 15.</b> Análisis de tejido adiposo y no adiposo de animales tratados con <i>H. silenoides</i> .....	50
<b>Cuadro 16.</b> Análisis de tejido adiposo y no adiposo de animales tratados con <i>H. philonotis</i> .....	51
<b>Cuadro 17.</b> Compuestos identificados por CG-EM en tejido adiposo y no adiposo de animales tratados con <i>H. silenoides</i> .....	53
<b>Cuadro 18.</b> Concentración inhibitoria cincuenta (CI <sub>50</sub> ) de los extractos de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> en el modelo <i>in vitro</i> de lipasas pancreática porcina.....	58
<b>Cuadro 19.</b> Compuestos identificados por CG-EM presentes en el excremento de ratas tratadas con el extracto acuoso de <i>H. silenoides</i> a la dosis de 100 mg/kg.....	60
<b>Cuadro 20.</b> Tiempos de retención de compuestos de referencia por HPLC.....	61
<b>Cuadro 21.</b> Rendimientos de los extractos y de los aceites esenciales de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> .....	63
<b>Cuadro 22.</b> Composición química de los aceites esenciales de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> .....	64

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Incremento del peso corporal durante la administración de las dietas en ratas macho Wistar.....	38
<b>Gráfica 2.</b> Energía total, carbohidratos, lípidos y proteínas consumidos durante la administración de dieta de cafetería o dieta balanceada.....	38
<b>Gráfica 3.</b> Efecto de los extractos de <i>H. silenoides</i> sobre el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta de cafetería.....	40
<b>Gráfica 4.</b> Efecto de los extractos de <i>H. philonotis</i> sobre el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta de cafetería.....	41
<b>Gráfica 5.</b> Efecto de la sibutramina sobre el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta de cafetería.....	42
<b>Gráfica 6.</b> Histograma de la distribución del tamaño de los adipocitos blancos en ratas macho Wistar.....	56
<b>Gráfica 7.</b> Histograma de la distribución del tamaño de los adipocitos pardos en ratas macho Wistar.....	56
<b>Gráfica 8.</b> Curva de la actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática porcina de los extractos de <i>H. silenoides</i> e <i>H. philonotis</i> .....	57
<b>Gráfica 9.</b> Cantidad de grasas presentes en heces de animales tratados con los extractos de <i>H. silenoides</i> .....	59
<b>Gráfica 10.</b> Curva de la actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática porcina de los compuestos identificados en <i>H. silenoides</i> .....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la sibutramina.....	12
<b>Figura 2.</b> Estructura química del orlistat.....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la lorcaserina.....	13
<b>Figura 4.</b> <i>Hypericum silenoides</i> Juss y su distribución .....	21
<b>Figura 5.</b> <i>Hypericum philonotis</i> Cham. & Schlecht y su distribución .....	22
<b>Figura 6.</b> Modelo de obesidad dietética .....	36
<b>Figura 7.</b> Crecimiento del corazón en animales tratados con el extracto metanólico de <i>H. silenoides</i> a la dosis de 100 mg/kg.....	49
<b>Figura 8.</b> Aspecto histológico del tejido adiposo blanco .....	54
<b>Figura 9.</b> Aspecto histológico del tejido adiposo pardo.....	55
<b>Figura 10.</b> Perfil cromatográfico de <i>H. silenoides</i> , <i>H. philonotis</i> e <i>H. perforatum</i> por HPLC ...	61
<b>Figura 11.</b> Aprobación del protocolo de investigación por el CICUAL.....	88
<b>Figura 12.</b> Espectro de masas de orlistat obtenido por impacto electrónico.....	89
<b>Figura 13.</b> Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno del orlistat.....	90
<b>Figura 14.</b> Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono-13 del orlistat.....	91

## INTRODUCCIÓN

La obesidad constituye uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Desde 1980, en algunas zonas de América, Reino Unido, este de Europa, Australia y Asia, la tasa de obesidad se ha triplicado (Pearce, 2010). El tratamiento terapéutico de este padecimiento incluye algunos fármacos, así como el uso de algunas plantas medicinales, entre las que destaca *Hypericum silenoides*, conocida en México como “tlanchalagua”. Otros usos que se le da a esta planta son para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Meckes *et al.*, 1995), úlceras, diaforética, digestiva, emética, febrífuga y diurética (Martínez-Alfaro *et al.*, 2001). Por otro lado *H. philonotis*, comúnmente llamada “vinagrillo”, no registra alguna aplicación en la medicina tradicional, sin embargo Husain *et al.*, (2011) sugieren el uso del género *Hypericum* para el tratamiento de la obesidad.

La obesidad es el resultado de un desequilibrio prolongado entre el consumo y el gasto de energía. Su etiología es múltiple, su desarrollo y evolución se asocia a numerosos y variados factores (Speakman *et al.*, 2008). Para el estudio de este padecimiento existen diferentes modelos animales, de entre los cuales destaca el modelo de obesidad, producido por la ingesta de una dieta de cafetería o dieta de supermercado (Rothwell y Stock, 1980; Naim *et al.*, 1985; Prats *et al.*, 1989; Lladó *et al.*, 1995, 1999).

Estudios realizados al extracto hidroalcohólico de la planta completa de *H. perforatum* demostraron que disminuye los niveles de glucosa en ratas diabéticas (Husain *et al.*, 2008; 2009). También se conoce que el extracto hidroalcohólico de *H. perforatum* disminuye la ganancia de peso corporal, parámetros séricos como lo son el colesterol, LDL, triglicéridos, glucosa e insulina. Adicionalmente este extracto incrementó los niveles de HDL en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y carbohidratos (Husain *et al.*, 2011). En otro estudio el extracto etanólico de las partes aéreas de *H. caprifolium* demostró tener un efecto anoréxico dosis dependiente en ratas (Braswell y Ahmed, 1999).

México cuenta con la presencia de 12 especies del género *Hypericum*, de las cuales las más importantes son *H. silenoides* e *H. philonotis* (Mendoza-Castelán y Lugo-Pérez, 2011; Hersch-Martínez, 1996). A la fecha estas especies, no cuentan con estudios farmacológicos, ni químicos, que aporten bases científicas para su posible uso en el tratamiento de la obesidad y sobrepeso, hecho que motivó la realización del presente trabajo.

# I FUNDAMENTO TEÓRICO.

## 1. Obesidad.

### 1.1. Definición y clasificación.

La obesidad es un padecimiento crónico, que se caracteriza por la acumulación de tejido adiposo (Hensrud y Klein, 2006) y se presenta cuando la ingesta de alimentos es superior a las necesidades del organismo (Devlin *et al.*, 2000; Fujioka, 2002). Internacionalmente, se considera que un individuo adulto presenta obesidad cuando su Índice de Masa Corporal (IMC<sup>1</sup>) es superior a 30 kg/m<sup>2</sup> (WHO, 1995).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002) el sobrepeso se define como un índice de masa corporal mayor a 25 kg/m<sup>2</sup> (Cuadro 1). La circunferencia de cintura es otra medida que permite identificar obesidad abdominal de acuerdo con diferentes puntos de corte. En niños y adolescentes se utilizan curvas de referencia de IMC para identificar a sujetos con sobrepeso u obesidad (Secretaría de Salud, 2010).

**Cuadro 1.** Clasificación de la obesidad y riesgo de enfermedad asociada.

Clasificación	Índice de Masa Corporal (kg/m <sup>2</sup> )	Riesgo de enfermedad
1. Bajo peso	< 18.5	Ninguno
2. Normal	18.5 - 24.9	Ninguno
3. Sobrepeso	25.0 - 29.9	Incrementado
4. Obesidad Tipo 1	30.0 - 34.9	Alto
5. Obesidad Tipo 2	35.0 - 39.9	Muy alto
6. Obesidad Tipo 3 (mórbida)	≥ 40	Extremadamente alto

El exceso de peso corporal (sobrepeso u obesidad) es reconocido como uno de los retos más importantes de salud pública en el mundo, dada su magnitud, rapidez de incremento y el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece; aumenta significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles o comorbilidades (Secretaría de Salud, 2010).

<sup>1</sup> La combinación del peso y la talla permite obtener diversos índices ponderales, que en general representa el peso relativo estadísticamente corregido por la talla. El IMC se calcula dividiendo el peso por el cuadrado de la talla.

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Talla}^2 \text{ (m}^2\text{)}}$$

## **1.2 Contexto global de la obesidad.**

La obesidad constituye uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Desde 1980, en algunas zonas de América, Reino Unido, este de Europa, Australia y Asia; la tasa de obesidad se ha triplicado (Pearce, 2010). De acuerdo a la OMS existen mil millones de adultos con sobrepeso y al menos 300 millones presentan obesidad. En el año 2000 en Estados Unidos el 64% de la población presentaba sobrepeso u obesidad (Flegal *et al.*, 2002), contribuyendo a la muerte de 300, 000 personas por año (Allison *et al.*, 1990; Flegal *et al.*, 2005; Flegal *et al.*, 2007).

La obesidad y el sobrepeso, ya no son problemas de salud restringido a las sociedades con un ingreso per cápita elevado, hoy en día estos padecimientos se presentan tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Pearce y Witten (2010), reportaron que para algunos países como Canadá, Egipto, Estados Unidos, Inglaterra, Sudáfrica, Australia y México; presentan un elevado porcentaje de población adulta con sobrepeso u obesidad ( $\geq 51\%$ ).

## **1.3 Cambios en la prevalencia de la obesidad en México.**

La prevalencia de la obesidad en los adultos mexicanos revela un franco incremento a través de los años. La **ENEC 1993** (Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas), mostró que la prevalencia era de 21.2% (Secretaría de Salud, 1993); los datos de la **ENSA 2000** (Encuesta Nacional de Salud) expresaron que el 25.1% de los adultos en nuestro país presentaban algún tipo de obesidad (Olaiz *et al.*, 2003), y en fecha más reciente, con mediciones obtenidas a partir de la **ENSANUT 2012** (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición), se encontró que 32.4% de los adultos de ambos sexos son obesos y el 38.8% padecen sobrepeso (Rojas-Martínez *et al.*, 2012, Secretaría de Salud, 2012).

Hoy en día, México ocupa el segundo lugar mundial de prevalencia de obesidad, después de Estados Unidos de América. La alta prevalencia de sobrepeso y obesidad representa un problema de salud pública prioritario que exige la puesta en marcha de una política nacional que reconozca el origen multifactorial del problema. La epidemia implica costos significativos para el sistema de salud pública, para la sustentabilidad del régimen de pensiones y para la estabilidad económica y social de la población, especialmente de los sectores más pobres (Lara *et al.*, 2008; Secretaría de Salud, 2010).

## **1.4 Etiología de la obesidad.**

La obesidad debe considerarse como una condición multifactorial; genética, cultural, socioeconómica, conductual y de situaciones que juegan un papel muy importante en la alimentación y el control de peso (Carek y Dickerson, 1999; Flegal *et al.*, 2002). En todos los países para los que hay datos disponibles, las

causas determinantes de la obesidad son: a) *consumo elevado de alimentos* de alta densidad energética, con bajo contenido de fibra, con altos niveles en sodio, así como de bebidas azucaradas; b) *niveles reducidos de actividad física* en el hogar, la escuela, el trabajo y en el transporte y c) *consumo de tabaco y alcohol* (Crowther, 2009; González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011).

### **1.5 Comorbilidades asociadas con la obesidad.**

La persona obesa está expuesta a una larga serie de riesgos para su salud, incluidas importantes comorbilidades: diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemias. Estas comorbilidades constituyen enfermedades que pueden llevar a una muerte prematura (Pi-Sunyer, 2003; Flegal *et al.*, 2007). Las pruebas de relación causal entre la obesidad y sus comorbilidades son numerosas; van desde los estudios de la salud poblacional (Wilson *et al.*, 1994; Olaiz-Fernández *et al.*, 2006; Barquera *et al.*, 2009; Rojas-Martínez *et al.*, 2012), en los que se demuestra una clara vinculación entre la obesidad, los problemas metabólicos y la enfermedad cardiovascular, pasando por la identificación de mecanismos fisiopatológicos: resistencia a la insulina, exceso de adipocitos y producción de adipocitocinas que inducen problemas metabólicos y cardiovasculares; así como alteraciones mecánicas que inducen problemas de movilidad del tubo digestivo o sobrecarga de las articulaciones, hasta llegar a la prueba más contundente de esta relación causal: la mejoría o normalización de los distintos padecimientos después de la pérdida de peso mediante tratamiento médico o quirúrgico (García-García *et al.*, 2010; Secretaría de Salud, 2010; Rojas-Martínez *et al.*, 2012).

La obesidad surge cuando el exceso de triglicéridos se acumula en el tejido adiposo. Simultáneamente estos triglicéridos pueden acumularse en tejido no adiposo, tales como el músculo, hígado, páncreas, riñón y corazón (van Herpen y Schrauwen-Hinderling, 2008). La excesiva acumulación de lípidos en el citoplasma celular provoca disfunción o muerte celular, proceso conocido como lipotoxicidad. Las personas que padecen obesidad son más propensas a desarrollar diabetes tipo 2 y problemas cardiovasculares. Distintos autores sugieren que la acumulación de la grasa ectópica es el puente que une a la obesidad y a las comorbilidades que acompañan a este padecimiento (van Herpen y Schrauwen-Hinderling, 2008).

## **2. Tejido adiposo.**

### **2.1 Tejido adiposo y sus particularidades.**

El tejido adiposo (TA) es uno de los más abundantes y representa del 15 al 20% del peso corporal del hombre, y del 20 al 25% en la mujer. Es un tejido especializado en el que predominan las células conjuntivas denominadas adipocitos, las cuales almacenan eficientemente energía en forma de triglicéridos (Cam *et al.*, 2002). El TA presenta nódulos linfoides en cantidad variable, siendo altamente abundantes en la grasa mesentérica. Estos nódulos influyen en la capacidad secretora del propio tejido, induciendo la expresión de receptores del Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en los adipocitos más próximos, así mismo se encuentran implicados en funciones inmunológicas y en la respuesta inflamatoria. El TA está inervado por doble partida sensorial y simpática, esta última íntimamente relacionada con fenómenos de lipólisis (Gideon *et al.*, 2008).

La función principal del TA es almacenar TRG, que provienen en su mayoría de los quilomicrones de la dieta y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) del hígado. La enzima clave es la lipoproteinlipasa (LPL). Esta enzima es sintetizada en el adipocito e hidroliza los triglicéridos convirtiéndolos en ácidos grasos libres. Estos últimos son captados por las mismas células, convirtiéndose finalmente en grasa (Gideon *et al.*, 2008). Los TRG almacenados en el tejido adiposo, constituyen la mayor reserva energética del organismo. Son un combustible compacto por su elevada densidad energética. Aportan 9 kcal/g al oxidarse, lo que lo convierte en un eficaz almacén energético transportable (Bender, 2009). El tejido adiposo está formado por dos tipos: el blanco y el pardo.

### **2.2 Tejido adiposo blanco (TAB).**

La función principal del TAB, es servir de lugar de almacenaje del exceso de energía metabólica que se acumula en forma de lípidos y que ésta pueda ser utilizada durante los períodos de privación calórica (dieta, ayuno, etc.). Sin embargo, el tejido adiposo blanco cumple además con una diversidad de funciones, actuando como tejido de sostén y protección, de aislamiento térmico, así como productor y reservorio de hormonas y otras sustancias como estrógenos, angiotensinógeno, lipoproteinlipasa, adipina, leptina, adiponectinas, adipoquinas y retinoides, entre los más conocidos (Ailhaud *et al.*, 1992).

Las principales características del tejido adiposo blanco se centran en sus funciones de almacenamiento (lipogénesis) y movilización de lípidos (lipólisis), funciones para las que se encuentra altamente especializado (Gesta *et al.*, 2007). El desarrollo del TAB es un proceso continuo que comienza antes del nacimiento, pudiéndose generar nuevos adipocitos a lo largo de la vida en respuesta a distintos estímulos,

como la sobrealimentación o la ingesta de ciertos alimentos con alto contenido de grasa. Diversos estudios en modelos de inducción de obesidad indican que los adipocitos, en respuesta al exceso de energía, aumentan inicialmente su tamaño y, posteriormente y de forma muy lenta, incrementan en número. Ambos procesos ocurren durante fases de balance energético positivo y el desarrollo de obesidad (Gregoire, 2001; Hausman *et al.*, 2001; Feve, 2005; Bartness y Song, 2007).

### **2.3 Tejido adiposo pardo (TAP).**

El tejido adiposo pardo fue considerado durante muchos años como un tejido característico de los animales invernantes, pero está también presente en roedores y en pequeños mamíferos, aumentando mucho en aquellos adaptados al frío y en mamíferos recién nacidos, incluido el hombre (Hao *et al.*, 2012). Se encuentra recubriendo la mayoría de los centros vitales (corazón, aorta y vías circulatorias). Ello es explicable ya que su función primaria es calentar la sangre de los animales invernantes durante el despertar de la hibernación (Morrison *et al.*, 2012).

Aunque el TAP mantiene una serie de funciones de almacenamiento de lípidos, es claramente diferente del tejido adiposo blanco, debido fundamentalmente a su capacidad termogénica. La respuesta termogénica se produce cuando la calorogénesis basal es insuficiente para cubrir los requerimientos termogénicos (por ejemplo, durante la exposición al frío). El TAP se estimula por el frío y por la dieta especialmente por dietas hipercalóricas (Clapman, 2012; Morrison *et al.*, 2012).

## **3. Modelos animales y experimentales de obesidad.**

En la actualidad se han desarrollado distintos modelos experimentales animales y no animales, adecuados para estudiar unas u otras causas de la obesidad o sus consecuencias y complicaciones (Speakman *et al.*, 2008; Crowther, 2009; González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011). Por tanto, el factor primordial para la elección del modelo experimental depende del tipo de obesidad que se desee estudiar. Existen dos características que son comunes en todos los modelos de obesidad experimental: ninguno es universalmente válido para el estudio de la obesidad, y todos tienen limitaciones (Bray *et al.*, 1990).

### **3.1 Clasificación.**

Desde el punto de vista etiológico, los modelos experimentales de obesidad se clasifican en neuroendocrinos, genéticos y nutricionales (Cuadro 2). Los modelos animales, han contribuido de manera fundamental al desarrollo histórico de la comprensión de los procesos básicos, que regulan nuestro equilibrio energético (Speakman *et al.*, 2008).

### 3.2 Modelos neuroendocrinos.

Los primeros modelos animales emplearon la destrucción de áreas específicas del hipotálamo. Se conocen diversos tipos de lesión hipotálmica que provocan obesidad. Tales lesiones pueden ser realizadas por métodos físicos (cortes con cuchilla, electrocoagulación...) o químicos (administración de aurotioglucosa, mostaza de bipiperidina, glutamato monosódico, etc.). La obesidad aparece cuando se lesionan áreas del hipotálamo ventromedial (York, 1996; Speakman *et al.*, 2008).

**Cuadro 2.** Modelos animales y experimentales de obesidad (York, 1996).

Origen	Causa asociada
Neuroendocrino	Lesiones: Electrolítico (VMH, PVN, amígdalas). Cortes (hipotálamo, cerebro medio). Químico (GTG, MSG, BPM, 60HDA, IA, KA). Viral (virus del moquillo canino). Ovariectomía. Antidepresivos.
Genético	Genes individuales (ob/ob, db/db, fa/fa, Cpefat, tub/tub, A <sup>y/a</sup> , KK). Genes múltiples (BSB, NZO, ratón AKR, Ratas OM). Transgénicos: Knockout, TAP, TAB, receptor $\beta_3$ -adrenérgico.
Nutricional	Alto contenido en grasas. Alto contenido de grasas y azúcares (sacarosa). Alto contenido de azúcares (sacarosa). Dieta de cafetería.

VMH = hipotálamo ventromedial; PVN = núcleo paraventricular; GTG = tiomalato de oro;  
MSG = glutamato monosódico; BPM = bipiperidil mostaza; IA = ácido iboténico; KA = ácido kaínico;  
TAP = Tejido adiposo pardo; TAB = Tejido adiposo blanco.

### 3 Modelos genéticos.

#### 3.3.1 Ratón obeso (ob/ob) y ratón diabético (db/db).

Dentro de los modelos de obesidad genética existen dos en ratones: el ratón obeso (ob/ob) y el ratón diabético (db/db). En ambos casos la herencia es de tipo autosómico recesivo. En los dos se produce un síndrome de diabetes-obesidad muy similar o casi idéntico, fisiopatológicamente hablando. En estos dos modelos se ha identificado la localización cromosómica donde reside el gen defectuoso. En el ratón obeso, el gen ob reside en el cromosoma 6 y en el ratón diabético el gen db reside en el 4 (Pomp, 1997; Pomp y Nielsen, 1999).

El gen *ob* parece ser el responsable de alteraciones en la síntesis y regulación de proteínas G, mientras que el gen *db* está implicado en la producción de anticuerpos (Leibel *et al.*, 1997). Tanto en los ratones obesos como en los diabéticos aparecen alteraciones en los canales iónicos de diversos tejidos. Sin embargo, en los dos modelos se ha postulado que el defecto primario causante de la obesidad reside en un mal funcionamiento del sistema neuroendocrino: del hipotálamo en el caso del *db/db*, y de las células adenohipofisarias y quizás también de otros tejidos en el ratón *ob/ob*. Adicionalmente en el ratón obeso (*ob/ob*) varios neuropéptidos de origen hipotalámico como la colecistoquinina (CCK), que es reconocida como una potente señal de saciedad, están presentes en concentraciones extremadamente bajas (Leibel *et al.*, 1997).

Por otra parte, en el ratón diabético (*db/db*) los niveles de CCK hipotalámica se encuentran elevados, lo que unido a las alteraciones observadas en canales iónicos y proteínas G, sugiere que existe una resistencia a la señal de saciedad. La incapacidad de responder adecuadamente a las señales de saciedad parece ser la base del desarrollo de la obesidad de estos ratones. Otras alteraciones que se manifiestan en primer término es un decremento en la termogénesis, reducción en el consumo tisular de oxígeno y ligera disminución de la temperatura corporal. Simultáneamente se produce hipertrofia e hiperplasia en los adipocitos, aumento del depósito de grasa, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa y aumento del peso corporal total. (Leibel *et al.*, 1997; Perusse *et al.*, 1999).

### **3.3.2 Rata Zucker genéticamente obesa (*fa/fa*).**

Es uno de los pocos modelos de obesidad heredable, con carácter autosómico recesivo, que ocurren en la rata. Fue descrito en 1962 por Zucker y Zucker, que lo obtuvieron por el cruce de ratas Sherman con Merck Stock. La obesidad se manifiesta únicamente en los animales homocigos (*fa/fa*) mientras que los heterocigotos (*fa/fa*) tienen fenotipo normal (Zucker y Zucker, 1961). En las cuatro o cinco primeras semanas de vida las ratas homocigotas y heterocigotas son fenotípicamente indistinguibles, pero a partir de ese momento se instaura la obesidad en las ratas homocigotas. La grasa se acumula en la zona abdominal y subcutánea, llegando a alcanzar grados de obesidad extremos (Zucker y Zucker, 1961).

Este modelo de obesidad se caracteriza por hiperfagia, hiperinsulinemia, aumento de la actividad de la LPL y de los niveles circulantes de ácidos grasos libres y aparición láctica del suero (Argilés, 1989). Las características más destacables de este modelo de obesidad, son el aumento de la eficacia metabólica en la utilización de sustratos, con disminución en la termogénesis postprandial a expensa de la grasa parda; la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, pero no en el tejido graso e hígado, lo que causa

hiperinsulinismo con aumento de la lipogénesis, hiperfagia y falta de sensibilidad a las señales de saciedad (Argilés, 1989).

### **3.4 Modelos dietéticos.**

Una hipótesis para explicar la rapidez con que se ha extendido la epidemia de obesidad en los humanos es la posibilidad de que nuestros sistemas reguladores se vean sobrepasados por los alimentos apetitosos de alta densidad energética y elevados en grasas, cuya disponibilidad ha aumentado en los últimos 30 años (Speakman *et al.*, 2008). Variados son los modelos experimentales de obesidad que se relacionan con esta hipótesis (Cuadro 2). En todos los casos intervienen dos factores fundamentales: la composición de la propia dieta, que condiciona su aporte calórico, y sus características organolépticas de sabor, olor, textura y temperatura, que la hacen más deseable induciendo hiperfagia (Speakman *et al.*, 2008).

#### **3.4.1 Dieta con alto contenido de grasas.**

La dieta normal de laboratorio contiene un 10% de aporte calórico en forma de grasa. En condiciones normales, los animales crecen y tienden a acumular cierta cantidad de grasa con el transcurso del tiempo. Cuando la porción de lípidos de la dieta se eleva por encima del 33% en aporte calórico, los animales de experimentación aumentan su ingesta calórica (hiperfagia), así como la eficacia energética de la dieta, volviéndose marcadamente obesos (York, 1996; Speakman *et al.*, 2008).

#### **3.4.2 Dieta con alto contenido de carbohidratos.**

Este tipo de dietas producen un incremento del 10 al 20% de la ingesta energética, con un aumento paralelo en la ganancia de peso y la acumulación de grasa. Este efecto es independiente del tipo de carbohidrato (glucosa, fructosa, sacarosa o polisacáridos digeribles), pero no de la cantidad administrada. Es decir, el grado de hiperfagia es proporcional al contenido de carbohidratos de la dieta, con el consecuente incremento en peso. Además es también dependiente de la forma de administración, ya que las soluciones acuosas azucaradas son más efectivas que la administración de carbohidratos sólidos (York, 1996; Speakman *et al.*, 2008).

#### **3.4.3 Dieta de cafetería o dieta de supermercado.**

Esta dieta, está compuesta por alimentos de naturaleza variada con alto contenido calórico y alta palatabilidad (características organolépticas elevadas), que incluyen galletas, chocolates, embutidos, quesos, caramelos, frutos secos, pan, leche condensada, etc. (Prats *et al.*, 1989; Lladó *et al.*, 1995).

Cuando a los animales de experimentación, se les ofrece una dieta con esta composición, estos incrementan su peso corporal hasta en un 60%, y la tasa de incremento de peso aumenta de un 50-200% sobre la de los animales que ingieren la dieta estándar de laboratorio. Como en otros casos, aumenta el depósito de grasa a costa de la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo. En este modelo *parece tener especial importancia la restricción de la actividad física*, en la que se encuentran las ratas enjauladas, comparadas con aquéllas a las que se les permite el acceso a una rueda giratoria para roedores, el incremento de peso se puede reducir hasta en un 30% (York, 1996; Speakman *et al.*, 2008).

El tratamiento de las comorbilidades de la obesidad representa un enorme reto para la investigación a nivel básico y clínico. Desafortunadamente, dada la complejidad de este padecimiento, las propuestas de tratamiento, con excepción del quirúrgico, no han sido suficientemente eficaces.

#### **4. Tratamiento de la obesidad.**

##### **4.1 Tratamiento quirúrgico.**

De acuerdo con los Institutos Nacionales de Salud en Estados Unidos los pacientes que son candidatos a una intervención quirúrgica son los que cumplen los siguientes criterios:

- Pacientes con un IMC mayor de 40 durante más de tres años.
- Pacientes con un IMC por encima de 35 y con padecimientos concomitantes potencialmente letales.
- Ausencia de causas endocrinas de la obesidad, abuso de alcohol y drogas (Pantoja, 2004).

Existen tres tipos de tratamiento quirúrgicos:

- **Procedimientos restrictivos.** El propósito es reducir la cantidad de alimento que se ingiere, sin alterar de manera importante la fisiología gastrointestinal. La técnica empleada con mayor frecuencia en la actualidad es la banda gástrica ajustable, la gastroplastía vertical con banda y gastrectomía tubular o manga gástrica (Pantoja, 2004).
- **Procedimientos para reducir la absorción.** Tienen la finalidad de disminuir la capacidad de absorción del intestino. Se divide en dos tipos: la derivación biliopancreática convencional (operación de Scopinano), y la derivación biliopancreática con switch duodenal (Pantoja 2004).
- **Procedimientos mixtos:** Algunos procedimientos combinan cierta restricción con disminución de la absorción. El ejemplo típico es la derivación gastroyeyunal en Y de Roux (bypass gástrico) (Pantoja, 2004).

## 4.2 Tratamiento farmacológico.

En el entendido de que la obesidad es un padecimiento complejo y de origen heterogéneo, se puede afirmar que el tratamiento farmacológico, es una herramienta útil como adyuvante de los cambios en el estilo de vida (Haslam y James, 2005; Wadden *et al.*, 2005). El fármaco antiobesidad ideal debe tener por lo menos las siguientes características:

- Promover la pérdida de peso de forma sostenida y clínicamente significativa.
- Proporcionar un beneficio que supere a los riesgos parciales del fármaco.
- Ser accesible para la mayor parte de los sujetos que sean candidatos al tratamiento farmacológico.

Los primeros fármacos empleados en este padecimiento, fueron los que facilitaban la sensación de saciedad. Su estructura deriva de la anfetamina, teniendo la mayoría el núcleo de feniletilamina (anfetaminas, dietilpropión, fenfluramina y dexfenfluramina). Su acción era preferentemente central, por incremento de la actividad dopaminérgica, noradrenérgica y serotoninérgica. El número de reacciones adversas provocada por estos fármacos (dependencia y cardiovascular), obligó a retirar estos productos del mercado (Connolly, 1997). Muy pocas son las opciones de fármacos para su uso en el tratamiento del sobrepeso y la obesidad, y actualmente existe una gran necesidad de nuevos fármacos, que sean seguros y eficaces. Hoy en día diversas moléculas se encuentran en estudios clínicos (Cuadro 3) y quizá en un futuro ofrezcan una opción farmacológica para este padecimiento (Weigle, 2003).

**Cuadro 3.** Fármacos antiobesidad en estudios clínicos.

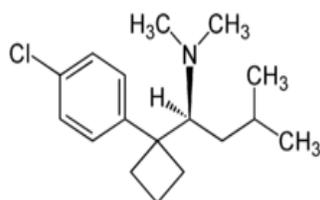
Clave	Mecanismo de acción	Compañía	Fase clínica
ATL-962	Inhibidor de la lipasa pancreática	Alizyme	IIb
SLV319	Antagonista del receptor CB <sub>1</sub>	Solvay Pharmaceuticals	IIb
SR58611A	Antagonista del receptor β <sub>3</sub> -adrenérgico	Sanofi-Synthelabo	IIa
Metreleptina	Modificación de leptina	Amgen	II
GI181771	Agonista CCK-A	GlaxoSmithKline	II
PYY(3–36)	Inhibición de la hormona PYY(3–36)	Nastech pharmaceutical	II
TM30338	Neuropéptido Y2 y antagonista Y4	7TMPharma	I/II
PramLintida	Retraso del vaciamiento gástrico	Amylin	II
1426	Mecanismo periférico	Sanofi-Aventis	IIa
CYT009GhrQb	Agonista de la grelina	Cytos Biotechnology	I/II
AOD9604	Hormona del crecimiento humano	Metabolic pharmaceuticals	IIb
P57	Supresor del apetito	Phytopharm	II

### 4.2.1 Sibutramina.

En sus orígenes este medicamento se desarrolló como un antidepresivo, pues actúa en el sistema nervioso central mediante la recaptura de monoaminas. No se demostraron sus efectos como psicofármaco pero sí

un incremento de la saciedad (MacNeel y Goa, 1998). La sibutramina estimula la termogénesis, pero este efecto desempeña un papel secundario en la pérdida de peso (Lean, 2001). La sibutramina es una amina terciaria que actúa a través de sus metabolitos activos, aminas primaria y secundaria, que se producen a partir de la desmetilación hepática (Figura 1). Estos metabolitos actúan a nivel central sobre receptores adrenérgicos ( $\alpha_1$  y  $\beta_1$ ) y serotoninérgicos (5HT<sub>2a</sub> y 5HT<sub>2c</sub>), inhibiendo la recaptura de serotonina, noradrenalina y dopamina (Lean, 2001).

**Figura 1.** Estructura química de la sibutramina.

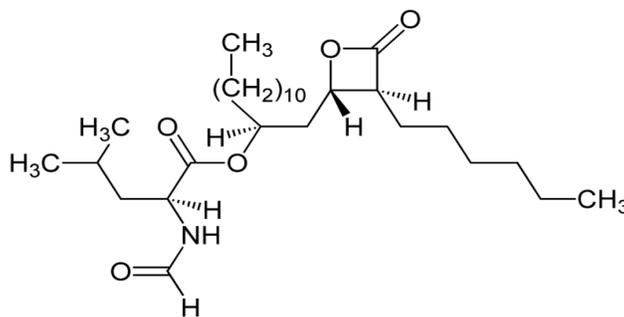


Los efectos secundarios más comunes de este fármaco son insomnio, náuseas, xerostomía (sequedad de la boca), y constipación intestinal (Padwal y Majumdar, 2007). En México, la COFEPRIS en el año 2010, después de analizar las reacciones adversas notificadas por el Centro Nacional de Farmacovigilancia, decidió retirar del mercado mexicano a los medicamentos con sibutramina. Las reacciones adversas presentadas fueron de tipo cardiovascular como los son taquicardia, hipertensión, síncope, arritmia, edema, opresión torácica, hipotensión, infarto agudo al miocardio y edema cerebral (COFEPRIS, 2010).

#### 4.2.2 Orlistat.

El orlistat (tetrahidrolipstatina) fue aprobado en 1998 como fármaco adyuvante en el tratamiento de la obesidad. Actúa mediante la inhibición de las lipasas gástrica y pancreática, lo que provoca la disminución de absorción intestinal de cerca del 30% de los lípidos provenientes de la dieta. El orlistat es un derivado de la lipstatina (Figura 2), producido por la bacteria *Streptomyces toxytricini* (Hauptman *et al.*, 1992).

**Figura 2.** Estructura química del orlistat.

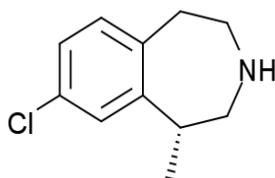


Los efectos adversos de orlistat son principalmente de naturaleza gastrointestinal, se manifiestan al inicio del tratamiento, suelen ser de carácter leve-moderado y desaparecen con el uso prolongado. En orden de frecuencia son las manchas oleosas procedentes del recto (27%), flatulencia con descarga fecal (24%), urgencia fecal (22%), heces grasas (20%), evacuación oleosa (12%), aumento de defecación (11%) e incontinencia fecal (8%). Además puede disminuir la absorción de vitaminas liposolubles, fundamentalmente la vitamina D (Padwal *et al.*, 2003).

#### 4.2.3 Lorcaserina.

Es un medicamento indicado para el tratamiento de la obesidad que fue desarrollado por el laboratorio *Arena Pharmaceuticals*. Su mecanismo de acción consiste en provocar la pérdida de apetito, mediante una acción agonista sobre los receptores de la serotonina del tipo 5-HT<sub>2C</sub> situados en el cerebro, lo cual ocasiona sensación de saciedad (Muñoz-Rivas, 2011).

**Figura 3.** Estructura química de la lorcaserina.



Esta indicado su empleo en pacientes con un índice de masa corporal mayor de 30, o en aquellos con índice de masa corporal mayor de 27 que presenten también otras patologías asociadas a la obesidad, como diabetes, hipertensión arterial o niveles elevados de colesterol en sangre (FDA, 2012). En los estudios que se han realizado, la lorcaserina ha sido en general un medicamento bien tolerado. El efecto secundario más frecuente fue dolor de cabeza, que ha sido experimentado por el 18% de los participantes vs 11% de los controles. Otros efectos secundarios han sido infecciones de tracto respiratorio superior, nasofaringitis, sinusitis y náuseas (Muñoz-Rivas, 2011).

#### 4.3 Uso de las plantas medicinales.

En México, las plantas medicinales se han utilizado desde nuestros antepasados para aliviar algunas enfermedades y aún, hoy en día son empleadas (Cox, 2000). La llamada medicina tradicional ha demostrado que puede utilizarse para el tratamiento de muchas enfermedades con resultados favorables (Taddei-Bingas *et al.*, 1999) y a precios más accesibles. Es posible encontrar en el mercado productos formulados con extractos secos de plantas (Moro y Basile, 2000), que son empleadas para el tratamiento de el sobrepeso y la obesidad (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento para la obesidad.

(Modificado de Moro y Basile, 2000).

Planta medicinal	Nombre común	Indicación terapéutica	Principio activo	Dosis diaria (mg)
<i>Amorphophallus koniac</i> Koch. (Araceae)	Konjac	Obesidad y alteraciones del metabolismo.	Fibra	1800-2004
<i>Ananas sativus</i> Schult. f. (Bromeliaceae).	Piña	Celulitis, edema y hemorroides.	Bromelina	112-234
<i>Betula alba</i> L. (Betulaceae)	Abedul	Celulitis, hipertensión y retención de líquidos.	Saponinas	2.7-3.6
<i>Camellia thea</i> Link. (Theaceae)	Té verde	Obesidad, celulitis y alteraciones del metabolismo de proteínas.	Cafeína	36-87
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)	Papaya	Obesidad, celulitis y problemas digestivos.	Papaína	No disponible
<i>Citrus aurantium</i> L. (Rutaceae)	Azahar	Obesidad.	Sinefrina	32
<i>Citrus decumana</i> Murr. (Rutaceae)	Toronja	Obesidad y celulitis.	Fibra y flavonoides	No disponible
<i>Filipendula ulmaria</i> Max. (Rosaceae)	Ulmaria	Obesidad, artritis y retención de líquidos	Quercetina y fitosteroles	No disponible
<i>Fucus vesiculosus</i> L. (Fucaceae)	Sargazo	Obesidad y celulitis.	Iodina	0.07-0.80
<i>Garcinia cambodia</i> Desr. (Clusiaceae)	Tamarindo	Obesidad y alteración de lípidos-glucosa.	Ácido hidroxicítrico	208-360
<i>Gelidium amansii</i> Lamour (Algae)	Agar	Obesidad, estreñimiento, gastritis y divertículos.	Agar-agar	2100
<i>Gymnema sylvestre</i> R. Br. (Asclepiadaceae)	Gurma	Obesidad y alteraciones del metabolismo de lípidos.	Ácido gymnémico	15
<i>Hieracium pilosella</i> L. (Asteraceae)	Vellosina	Obesidad, celulitis, retención de agua e hipertensión.	Ácido clorogénico	60
<i>Hydrocotyle asiatica</i> L.	Centella asiática	Celulitis y fragilidad capilar.	Triterpenos	100-124
<i>Hypericum silenoides</i> Juss.	Tlanchalagua	Control de peso, obesidad y quemador de grasa.*	No se conoce(n)	-
<i>Ortosiphon stamineus</i> Benth	Ortosifón	Obesidad y mantenimiento de peso.	Flavonas	1.8
<i>Paullinia sobilis</i> Mat. (Sapindaceae)	Guaraná	Obesidad y alteraciones del metabolismo de lípidos.	Cafeína y ácido tánico	44-55
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Fabaceae)	Frijol	Obesidad y mantenimiento de peso.	Fitocomplejo total	992-1800
<i>Plantago ovata</i> Forks. (Plantaginaceae)	Plantago	Obesidad y estreñimiento.	Mucílago	540-1620
<i>Rheum officinale</i> Baill. (Polygonaceae)	yào yòng dà huán	Estreñimiento, hemorroides y enfermedades del hígado.	Ácido tánico	600
<i>Taraxacum officinale</i> (Asteraceae)	Diente de león	Celulitis y alteraciones del metabolismo de la glucosa- lípidos.	Inulina y esteroles	0.9-1.8

\* Hersch-Martínez, 1996; Long y Attolini, 2009; Mendoza-Castelán y Lugo-Pérea, 2011.

## 5. Antecedentes botánicos y etnobotánicos del género *Hypericum*.

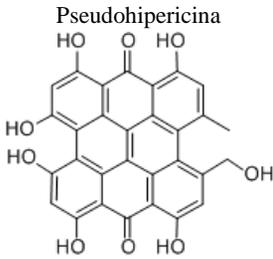
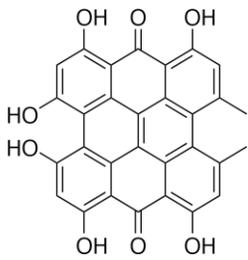
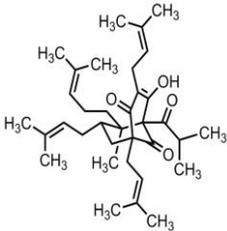
Este género pertenece a la familia *Hypericaceae*. Son plantas herbáceas anuales o perennes, o bien arbustivas, rara vez arborescentes; tallos largos con pelos simples; hojas opuestas o en ocasiones verticiladas, sésiles o cortamente pecioladas, con glándulas transparentes amarillas o bien las glándulas oscuras en la superficie y en los márgenes; inflorescencias en forma de cimas terminales o axiliares o bien, reducidas a una sola flor, pedicelos, brácteas y bacterolas presentes; sépalos 5, ocasionalmente 4 desiguales, imbricados o valvantes, de color amarillo, rojo o anaranjado, a menudo con estrías rojas, punteados con glándulas amarillas o negras (Rodríguez-Landa y Contreras, 2003). El género comprende aproximadamente 400 especies bien representadas en regiones templadas y subtropicales del mundo (Rodríguez-Landa y Contreras, 2003). La especie están clasificadas en diferentes secciones (entre 30-50 según el autor), pudiendo ser diferenciadas en base a características morfológicas tales como el fenotipo de la planta, posición de las hojas, organización de las flores y número de estambres y carpelos, siendo el principal parámetro de diagnóstico para caracterizar el género, la presencia de estructuras secretoras (Tutin *et al.*, 1968; Avato, 2005).

### 5.1 Composición química del género *Hypericum*.

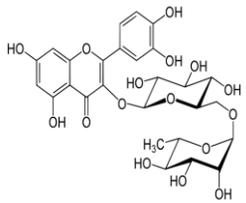
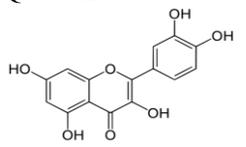
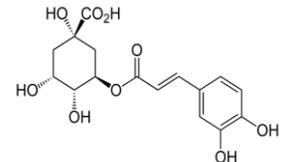
Los estudios fitoquímicos del género *Hypericum* comenzaron en 1830 a partir de la obtención de un compuesto al que Burchner denominó "*Hypericum rojo*" y que más tarde en 1911 se rebautizó con el nombre de hipericina (Tutin *et al.*, 1968; Avato, 2005). Por lo que se refiere a su composición química, este género contiene numerosos componentes con actividad biológica, como las naftodiantronas (principalmente hipericina y pseudohipericina), flavonoides (quercetina, kaenferol, luteolina), heterósidos de quercetina (rutina, hiperósido, quercitrina), biflavonoides (I3,II8-biapigenina y I3',II8-biapigenina), derivados prenilados del floroglucinol (como hiperforina y adhiperforina), trazas de xantonas, taninos, ácidos fenólicos, diterpenoides, triterpenoides, carotenoides y esteroides (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Nahrstedt y Butterweck, 1997; Schulz *et al.*, 1998; Buendía Sánchez, 2000; Barnes *et al.*, 2001; Paredes-Salido y Roca-Fernández, 2003; Vanaclócha y Cañigüeral, 2003

Otros compuestos presentes en el género *Hypericum* son los taninos catéquicos (3-16 %), pectina, colina, adhiperforina (0.2-1.9%), xantonas, ácido caféico, *p*-cumárico, ácido ferúlico e isoferúlico, alcohol cerílico, carotenoides (luteolina, luteoxantina, violaxantina, trollicromona y cis-trollicromona),  $\beta$ -sitosterol, aminoácidos, vitamina C, escopoletina (Alireza, 2012). Del extracto metanólico de las raíces de *H. perforatum*, proveniente de Austria, se aislaron las xantonas: 1,6-dihidroxi-5-metoxi-4',5'-dihidro-4',4',5'-trimetilfurano-(2-xantona), 4,6-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona y cis-kielcorina (Crockett *et al.*, 2011). Algunos de estos compuestos se ilustran en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Compuestos presentes en el género *Hypericum*.

Estructura	Tipo de compuesto	Parte estudiada	Especie	Referencias
<p>Pseudohipericina</p> 	Naftodiantrona	Flores y hojas	<i>H. androsaemum</i> L. <i>H. aviculariifolium</i> Jaub. & Spach. <i>H. barbatum</i> Jacq. <i>H. bithynicum</i> Willd. <i>H. boissieri</i> Petr. <i>H. hirsutum</i> L. <i>H. inidorum</i> Wild. <i>H. montbretii</i> Spach. <i>H. olympicum</i> L. <i>H. perforatum</i> L. <i>H. polyphyllum</i> Bois. et Balansa. <i>H. rochelii</i> Griseb. et Schenk. <i>H. rumeliacum</i> Boiss. <i>H. triquetrifolium</i> T.	Brockmann y Sanne, 1957. Makovetskaya y Maksjutina, 1991. Kitanov, 2001. Smelcerovic <i>et al.</i> , 2006. Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008. Crockett <i>et al.</i> , 2011.
<p>Hiperacina</p> 			Naftodiantrona	Flores y hojas Frutos
<p>Hiperforina</p> 	Derivado del floroglucinol	Flores y hojas		

**Cuadro 5.** Compuestos presentes en el género *Hypericum* (continuación).

Estructura	Tipo de compuesto	Parte estudiada	Especie	Referencias
<p>Rutina</p> 	Flavonoide	Semillas Partes aéreas Flores Frutos	<i>H. androsaemum</i> L. <i>H. hyssopifolium</i> Vill. <i>H. hirsutum</i> L. <i>H. linarioides</i> Bosse. <i>H. montanum</i> L. <i>H. montbretii</i> Spach. <i>H. perforatum</i> L. <i>H. perfoliatum</i> L. <i>H. richeri</i> <i>H. tetrapterum</i> Fries <i>H. triquetrifolium</i> T.	Brockmann y Sanne, 1957. Makovetskaya y Maksiutina, 1991. Kitanov, 2001. Smelcerovic <i>et al.</i> , 2006. Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008. Crockett <i>et al.</i> , 2011.
<p>Quercetina</p> 	Flavonoide	Semillas Partes aéreas	<i>H. androsaemum</i> L. <i>H. aviculariifolium</i> Jaub. & Spach. <i>H. bithynicum</i> Boiss. <i>H. heterophyllum</i> Vent. <i>H. hyssopifolium</i> Vill. <i>H. montbretii</i> Spach. <i>H. montanum</i> L. <i>H. nummularioides</i> Trautv. <i>H. organifolium</i> Willd. <i>H. orientale</i> L. <i>H. perforatum</i> L. <i>H. perfoliatum</i> L. <i>H. pruinatum</i> Boiss. & Balansa. <i>H. scabrum</i> L. <i>H. triquetrifolium</i> Turra.	Smelcerovic <i>et al.</i> , 2006. Smelcerovic <i>et al.</i> , 2008. Crockett <i>et al.</i> , 2011.
<p>Ácido clorogénico</p> 	Ácido fenólico	Partes aéreas Flores Frutos	<i>H. androsaemum</i> <i>H. hirsutum</i> <i>H. hyssopifolium</i> <i>H. montanum</i> <i>H. perforatum</i> L. <i>H. richeri</i> <i>H. tetrapterum</i> <i>H. triquetrifolium</i> Turra.	Maggi <i>et al.</i> , 2004. Crockett <i>et al.</i> , 2011. Hosni <i>et al.</i> , 2011.

## 5.2 Composición química del aceite esencial del género *Hypericum*.

La composición química del aceite esencial de *H. perforatum*, comenzó a ser investigada en Francia, los compuestos reportados fueron 2-metiloctano (45%) y  $\alpha$ -pineno (24%). Otros terpenos presentes en *H. perforatum* son  $\beta$ -cariofileno y  $\gamma$ -terpineno (Mathis y Ourisson, 1964 a y b). El principal compuesto del aceite esencial de las partes aéreas de *H. perforatum* provenientes de Turquía, Serbia e India es el  $\alpha$ -pineno (5.1–67.3%). Radusiene *et al.*, analizó la composición del aceite esencial proveniente de las flores y las hojas de esta planta. Los principales componentes fueron óxido de cariofileno, espatuleno y viridiflorol (Radusiene *et al.*, 2005). En el cuadro 6 se enlistan algunos otros compuestos presentes en los aceites esenciales de este género.

**Cuadro 6.** Componentes químicos del aceite esencial del género *Hypericum* (Santos *et al.*, 1999).

<i>Hypericum</i>	Parte estudiada	Origen	Principales compuestos (>5%)
<i>H. androsaemum</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Portugal	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> 28%, $\beta$ -cariofileno 14%, germacreno-D 12%, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> 6%.
<i>H. ericoides</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores tallos	España	$\alpha$ -Curcumeno 10-20%, $\alpha$ -pineno 5-10%, $\gamma$ -muroleno 5-10%, $\delta$ -cadineno 5-10%.
<i>H. humifusum</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Portugal	$\alpha$ -Pineno 81%, $\beta$ -pineno 5%.
<i>H. linarifolium</i> Vahl.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Portugal	$\alpha$ -Pineno 31%, $\beta$ -cariofileno 12%, <i>n</i> -undecano 7%, $\beta$ - pineno 5%.
<i>H. perforatum</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Portugal	$\alpha$ -Pineno 50%, <i>n</i> -nonano 17%, <i>n</i> -undecano 9%.
<i>H. perforatum</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Italia	2-Metiloctano 16%, $\alpha$ -pineno 11%, dodecanol 5%.
		India	$\alpha$ -Pineno 67%, <i>n</i> -nonano 5%, acetato de geranilo 5%.
		Turquía	Cariofileno 5%.
		Portugal	$\alpha$ -Pineno 62%, 3-careno 8%, $\beta$ -cariofileno 6%.
<i>H. pulchrum</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Portugal	$\alpha$ -Pineno 50%, $\beta$ -pineno 13%, germacreno-D 5%
<i>H. scabrum</i> L.	Partes aéreas secas hojas flores frutos	Turquía	$\alpha$ -Pineno 72%, $\beta$ -cariofileno 5%.

### 5.3 Actividad biológica del género *Hypericum*.

Las especies del género *Hypericum* se han utilizado desde hace tiempo en la medicina popular como remedio de heridas, infecciones urinarias y para aliviar los desórdenes del sistema nervioso (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Schulz *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 2001; Avato, 2005). Sin embargo en los últimos años han recibido una especial atención, debido a las propiedades antidepresivas encontradas tanto en la experimentación básica como clínica para los extractos de *H. perforatum* (Butterweck *et al.*, 1997, 1998; Brenner *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2001; Greeson *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2001; Schulz, 2001, 2002; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003).

*Hypericum perforatum* también llamada hierba de San Juan, está ampliamente distribuida en Europa, Asia, Norte de África y Norteamérica. Con respecto al mecanismo de acción de *H. perforatum* en el tratamiento de la depresión, no se conoce con exactitud, sin embargo se le atribuye la capacidad de provocar cambios en los niveles de neurotransmisores cerebrales. Se ha observado que inhibe la recaptura de serotonina, noradrenalina y dopamina, y, además, actúa sobre la neurotransmisión mediada por glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA). También se ha estudiado su influencia sobre la expresión de las citocinas estimuladas en sujetos sanos y pacientes con depresión, observándose una marcada inhibición en la liberación de interleucina 6 (IL-6) estimulada, por lo que se cree que el mecanismo de acción podría deberse a una modulación inmunológica en los sistemas neurohormonales (Bombardelli y Morazzoni, 1995; Barnes *et al.*, 2001; Greeson *et al.*, 2001; Gnerre *et al.*, 2001; Roz *et al.*, 2002; Müller, 2003; Rodríguez-Landa y Contreras, 2003).

Husain *et al.*, reportaron que el extracto de *H. perforatum* presenta actividad hipoglucemiante en ratas diabéticas (Husain *et al.*, 2008; 2009). Otro estudio demostró que el extracto hidroalcohólico de *H. perforatum* disminuye la ganancia de peso corporal, parámetros séricos (colesterol total, LDL-colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina) e incrementa HDL-colesterol en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y carbohidratos (Husain *et al.*, 2011). Por otro lado, un estudio realizado al extracto etanólico de las partes aéreas de *H. caprifolium* Bois demostró tener un efecto anoréxico y reductivo del peso corporal dosis dependiente en ratas (Braswell y Ahmed, 1999). Algunos autores han sugerido que el género *Hypericum* puede ser empleado para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad (Husain *et al.*, 2011).

Aunque *H. perforatum* es la especie medicinal más estudiada y la que presenta mayor interés en la actualidad por ser empleada en la clínica; existen otras especies del género *Hypericum* que están siendo investigadas. Se han encontrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, analgésicas, antiinflamatorias y/o antidepresivas para otras especies de *Hypericum*, como por ejemplo *H.*

*androsaemum*, *H. barbatum*, *H. brasiliense*, *H. calycinum*, *H. caprifoliatum*, *H. cordatum*, *H. drummondii*, *H. empetrifolium*, *H. hircinum*, *H. hirsutum*, *H. hyssopifolium*, *H. patulum*, *H. richeri*, *H. rumeliacum subsp. apollinis*, o *H. triquetrifolium*, entre otras (Decosterd *et al.*, 1991; Jayasuriya *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 1995; Öztürk *et al.*, 1996, 2002; Apaydin *et al.*, 1999; Daudt *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2000, 2001; Pistelli *et al.*, 2000; Gnerre *et al.*, 2001; Trovato *et al.*, 2001; Rieli-Mendes *et al.*, 2002; Cakir *et al.*, 2003; Couladis *et al.*, 2003; Heilmann *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2005; Savikin *et al.*, 2007).

#### **5.4 El género *Hypericum* en México.**

Doce especies del género *Hypericum* están presentes en México. (*H. denticulatum*, *H. fastigiatum*, *H. formosum*, *H. galinum*, *H. hypericoides*, *H. moranense*, *H. mutilum*, *H. paniculatum*, *H. pauciflorum*, *H. philonotis*, *H. silenoides* e *H. simulans*) (Rodríguez, 1996). De estas 12 especies solo *H. silenoides* Juss, cuyo nombre popular es “tlanchalagua”, es utilizada para la disminución de peso corporal (Hersch-Martínez, 1996; Long y Attolini, 2009; Mendoza-Castelán y Lugo-Pérez, 2011). El nombre común de *H. philonotis* Cham. & Schlecht. es “vinagrillo” y no existe ningún reporte de empleo en la medicina tradicional (Rodríguez, 1996).

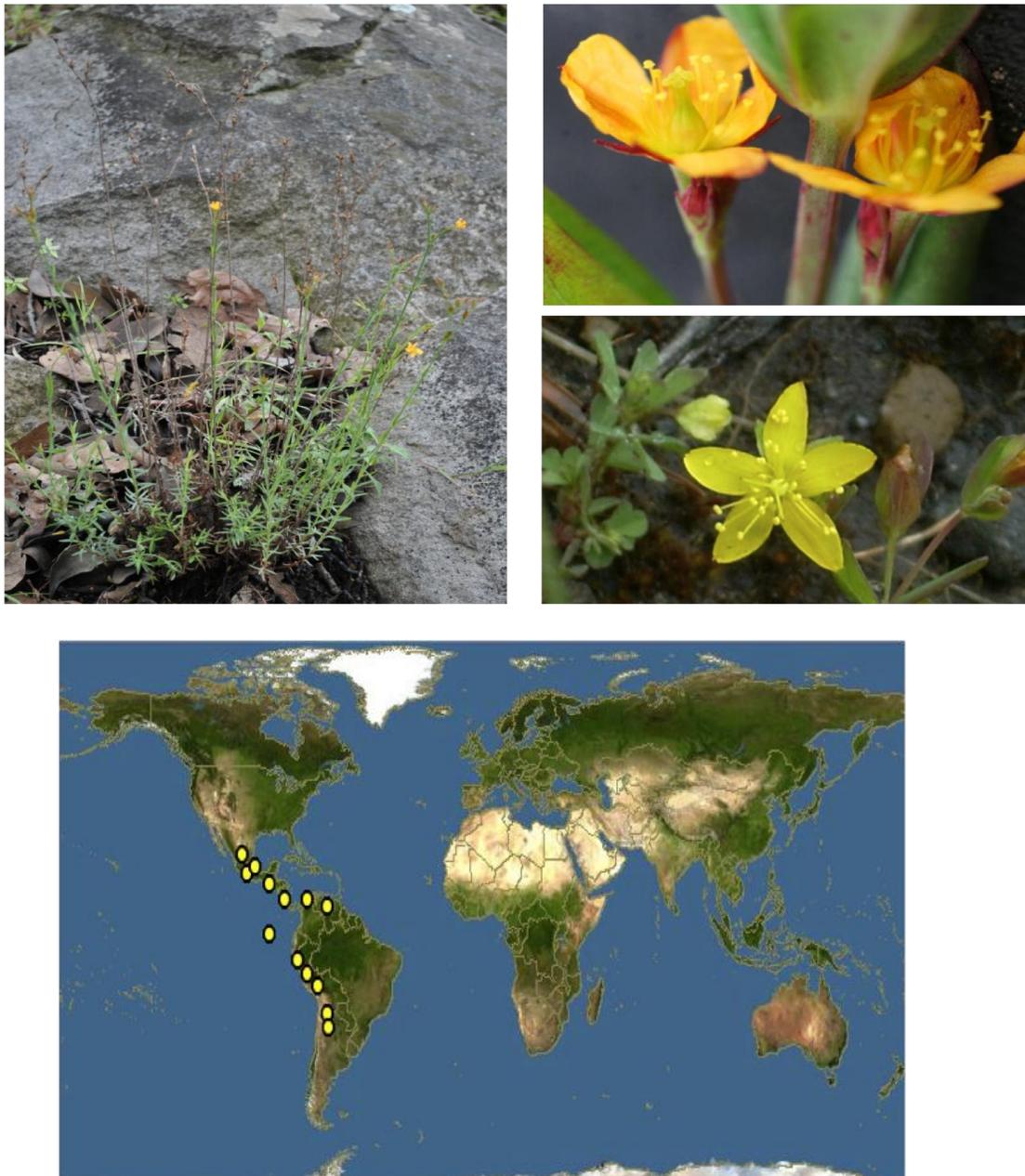
#### **5.5 *Hypericum silenoides* Juss.**

Esta planta pertenece a la familia *Hypericaceae*, sus nombres comunes son hipérico, h'antun wamal, sanguinaria, taxinoxihuitl, tenchalita, tlanchalahua, tlanchinole (Figura 4). Es una planta herbácea generalmente perenne, a veces anual de 4 a 60 cm de alto; tallos cuadrangulares, erectos o decumbentes, ramificados desde la base, en ocasiones rojizos o con manchas rojas, entrenudos de 1.5 a 3 cm de largo; hojas sésiles, linear-lanceoladas u oblongo-lanceoladas, margen entero a veces incurvado, en formas variables en forma y densidad, delgadas; inflorescencias en forma de cimas terminales compuestas con 3 a 15 flores; pétalos amarillos o anaranjados con algunos tintes rojizos (Rodríguez, 1996).

Es un elemento propio de bosques de coníferas (*Pinus sp.*) y de encino (*Quercus sp.*); frecuentemente en claros o en la vegetación secundaria derivada; también en zonas fangosas. Esta especie se distribuye en regiones montañosas húmedas, siguiendo las grandes cordilleras americanas desde México hasta Argentina (Rodríguez, 1996). Las partes aéreas de la planta se emplean para la pérdida de peso y como “quemador de grasa”. Se toma el cocimiento de la planta completa antes de la ingesta de los alimentos (Hersch-Martínez, 1996; Long y Attolini, 2009; Mendoza-Castelán y Lugo-Pérez, 2011). Adicionalmente, las comunidades indígenas de Chiapas, como los Tzotziles y los Tzeltales, la emplean para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Meckes *et al.*, 1995).

En Cuetzalán del Progreso, Puebla los pobladores emplean *H. silenoides* para el tratamiento de las úlceras (Martínez-Alfaro *et al.*, 2001). Algunos otros usos de esta planta son como aromaterapia de Bach, amarga, diaforética, digestiva, emética, febrífuga, hepática, homeopática, estomacal, tónica, diurética (Matínez-Alfaro *et al.*, 2001). A los extractos acuoso y etanólico de *H. silenoides*, se les determinó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) en el ensayo de toxicidad empleando larvas de *Artemia salina*. La dosis letal del extracto acuoso fue de 545 µg/mL mientras que para el extracto etanólico fue de 45 µg/mL (Bussmann *et al.*, 2011).

**Figura 4.** *Hypericum silenoides* Juss y su distribución.



### 5.6 *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht.

Planta herbácea anual o perenne, erecta, de 7 a 60 cm de alto (Figura 5); tallos ramificados desde la base, cuadrangulares, rojizos, entrenudos de 0.2 a 2.5 cm de largo; hojas sésiles u oblongas, de 0.9 a 2.5 cm de largo por 0.2 a 1 cm de ancho, ápice obtuso, base cuneada, margen entero; inflorescencia en forma de cimbras compuestas, con 5 a 30 flores, pedicelos de 1 a 4 mm de largo; sépalos lanceolados u oblongos, de 1.5 a 6 mm de largo, desiguales; pétalos amarillos o anaranjados, oblanceolados, de 2.5 a 4 mm de largo; estambres 5 a 9 libres; cápsula cilíndrica a elipsoide, rojo-púrpura; semillas cilíndricas de 0.3 a 0.6mm de largo, de color café, con estrías longitudinales difusas (Rodríguez, 1996). En México la planta esta distribuida en el centro y sur. Es una planta común, sobre todo en el norte de Michoacán, sin problemas de supervivencia en la actualidad (Rodríguez, 1996).

**Figura 5.** *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht. y su distribución.



## II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La prevalencia del sobrepeso y la obesidad se ha incrementado en todo el mundo tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo (Neovius y Narbro, 2008). En México la prevalencia de obesidad y sobrepeso se ha triplicado a partir de 1980, destacando el incremento en la población adulta, donde el 32.4% de la población padece sobrepeso y el 32.4% obesidad (Secretaría de Salud, 2012).

En todo el mundo se han hecho grandes esfuerzos, para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la obesidad. Sin embargo solo pocos agentes han sido introducidos al mercado para el tratamiento de la obesidad: orlistat (Xenical<sup>®</sup>) un inhibidor de la absorción de grasa, sibutramina (Reductil<sup>®</sup> o Meridia<sup>®</sup>), un supresor de apetito (Lewis *et al.*, 2002) y recientemente lorcaserina (BELVIQ<sup>®</sup>), un anoréxico (Muñoz-Rivas, 2011; FDA, 2012). La administración de estos medicamentos causa efectos secundarios como boca seca, constipación, insomnio, náuseas y mareos (Lewis *et al.*, 2002). Una alternativa para el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso, es el uso de plantas medicinales, en especial de aquellas que pertenecen al género *Hypericum* (Hussain *et al.*, 2011). Estudios previos han demostrado que el extracto hidroalcohólico de la planta completa de *H. perforatum* presenta actividad hipoglucemiante en ratas diabéticas (Husain *et al.*, 2008; 2009).

También se conoce que el extracto hidroalcohólico de *H. perforatum* disminuye la ganancia de peso corporal, parámetros séricos (colesterol, LDL, triglicéridos, glucosa e insulina) e incrementa las HDL en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y carbohidratos (Husain *et al.*, 2011). Adicionalmente el extracto etanólico de las partes aéreas de *H. caprifolium* demostró un efecto anoréxico y reducción de peso corporal dosis dependiente en ratas (Braswell y Ahmed, 1999).

En México se tiene la presencia de 12 especies del género *Hypericum*. De las cuales las más importantes son *H. silenoides* e *H. philonotis*, de éstas solo la primera especie es empleada en la medicina tradicional para la pérdida de peso (Hersch-Martínez, 1996; Mendoza-Castelán y Lugo-Pérez, 2011); mientras que *H. philonotis* no presenta un uso definido en la medicina tradicional. Sin embargo Hussain *et al.*, (2011) han sugerido el empleo del género *Hypericum* para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad.

A la fecha *H. silenoides* e *H. philonotis*, no cuentan con estudios farmacológicos, ni químicos, que aporten bases científicas para su posible uso en la obesidad y sobrepeso. Por lo que en el presente trabajo se pretende identificar el efecto antiobesidad de cada una de las plantas en modelos *in vivo* e *in vitro*.

### III HIPÓTESIS.

*Hypericum silenoides* e *Hypericum philonotis* forman parte del género *Hypericum*, mismo género al que pertenece la Hierba de San Juan (*H. perforatum*). A esta última planta se le ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la depresión ligera a moderada y para uno de sus metabolitos secundarios, la hiperforina. El mecanismo de acción antidepresivo de la hiperforina es a través de la inhibición de la recaptura de serotonina. Estudios previos encontraron que el extracto hidroalcohólico preparado con *H. perforatum*, presenta actividad antiobesidad por diferentes mecanismos farmacológicos como lo son hipolipidémico, hipoglucémico y que además incrementa la cantidad de HDL en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas y carbohidratos. Por consideraciones quimiotaxonómicas se espera que los extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis* ejerzan un efecto antiobesidad por algunos mecanismos farmacológicos tales como antidepresivo, anoréxico, hipolipidémico ó hipoglucémico.

El orlistat es un fármaco empleado en el tratamiento de la obesidad, su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la lipasa pancreática, por lo que es posible que un mecanismo farmacológico alternativo de *H. silenoides* e *H. philonotis* sea a través de la inhibición de esta enzimas.

## IV OBJETIVOS.

### 4.1 Objetivo general

Realizar un estudio de las propiedades farmacológicas y químicas de las partes aéreas de *H. silenoides* e *H. philonotis*, para evaluar su efecto antiobesidad en modelos *in vivo* e *in vitro*.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso de las partes aéreas de *H. silenoides* e *H. philonotis*, sobre la disminución del peso corporal en ratas alimentadas con una dieta de cafetería (alimentos mexicanos).
2. Cuantificar los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos después de 35 días de tratamiento con *H. silenoides* e *H. philonotis*.
3. Determinar la actividad antidepresiva de *H. silenoides* e *H. philonotis* en el modelo de nado forzado.
4. Determinar la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática porcina de *H. silenoides* e *H. philonotis*.
5. Determinar la actividad de *H. silenoides* e *H. philonotis* en tejidos adiposos y no adiposos.
6. Analizar el efecto del extracto más activo sobre la lipólisis a través de la composición química de las grasas provenientes de tejidos adiposos y no adiposos.
7. Evaluar la actividad del extracto que presente mayor actividad sobre el número y tamaño de adipocitos blancos y pardos.
8. Establecer la composición química del extracto que presente mayor actividad por HPLC.
9. Evaluar a los compuestos del extracto que presente mayor actividad en el modelo *in vitro* de la lipasa pancreática porcina.
10. Establecer la composición química del aceite esencial de ambas especies.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Material vegetal.

*Hypericum silenoides*, se compró en el mercado de Sonora en la Ciudad de México, durante el mes de febrero del 2010. Una muestra se depositó en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social y se identificó por la M. en C. Abigail Aguilar. El ejemplar se registró con el número 15542.

*Hypericum philonotis*, se colectó en el municipio de Pátzcuaro Michoacán, México el día 7 de Septiembre del 2010. Coordenadas geográficas 19° 57' 29.3" latitud Norte y 100° 09' 24.9" longitud Oeste. La planta se identificó y registró por el Dr. Sergio Zamudio en el "Instituto de Ecología Centro Regional del Bajío" con el número 14864.

### 5.2 Preparación de los extractos.

#### 5.2.1 Extractos orgánicos.

Las partes aéreas de *H. silenoides* e *H. philonotis* se secaron a la sombra y se trituraron en un molino manual. Cinco kilogramos de *H. silenoides* se extrajeron 3 veces por maceración por períodos de 3 días y de manera sucesiva con hexano (20 L), diclorometano (20 L) y metanol (20 L). Los extractos se filtraron y se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio (Büchi, B-480) para eliminar el disolvente. El mismo procedimiento fue aplicado a tres kilogramos de *H. philonotis*.

#### 5.2.2. Extracto acuoso.

Quinientos g de las partes aéreas de *H. silenoides* se cortaron en pequeños trozos y sometidos a un proceso de decocción durante 30 minutos dentro de un matraz junto con 2 L de agua destilada. Se dejó enfriar y después de filtrado se concentró en un evaporador rotatorio con bomba de alto vacío a 72 mbars (Büchi, V-850) y a una temperatura de 50°C.

### 5.3 Obtención del aceite esencial.

Los aceites esenciales se obtuvieron de las partes aéreas secas de *H. silenoides* e *H. philonotis* a través de una destilación por arrastre con vapor de agua. El tiempo de destilación fue de 3 horas. Los aceites se guardaron en viales de color ámbar, manteniéndose en refrigeración (FHEUM, 2001).

### 5.4 Animales.

Se emplearon ratas macho Wistar con un peso corporal entre 290-320 g. Los animales se colocaron en

grupos de seis, dentro de cajas de polipropileno en condiciones controladas de luz y temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Todos las ratas tuvieron acceso a alimento balanceado comercial (Teklad Global Rodent Diets, Harlan) y agua *ad-libitum*. Los animales se trataron siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, adoptada en nuestro laboratorio para el cuidado y experimentación con animales. El protocolo se aprobó el 16 de Mayo del 2011 por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química, UNAM. OFICIO/FQ/CICUAL/020/11 (Anexo 1).

### **5.5 Fármacos y sustancias.**

Clorhidrato de sibutramina (Helm de Mexico S.A. de C.V.). La enzima lipasa tipo II porcina y el palmitato de p-nitrofenilo, se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich (St. Louis Mo, EUA); tris(hidroximetil)aminometano se adquirió de USBiological (Swampscott, MA, EUA); el fármaco orlistat se extrajo de capsulas de Xenical® (ROCHE®). La identificación del orlistat se realizó por medio de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (Anexo 2).

La hiperforina, hipericina y pseudohipericina se adquirieron de ChromaDex-kit-00019545-005 (USA); la quercetina de Fluka Chemicals (Sigma-Aldrich División, Milán, Italia); la rutina de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); el ácido clorogénico de Extrasynthèse (Genay, Francia). El acetonitrilo y metanol fueron de grado HPLC de J.T. Baker (Deventer, Países Bajos); ácido fosfórico de Ashland (Milán, Italia). El agua empleada para HPLC se purificó por un sistema Millipore-Milli-Qplus (Milford, MA, USA). El extracto de *H. perforatum* se compró en la tienda GNC (frasco con 90 cápsulas-lote 7129KL19429). Los otros reactivos fueron de grado analítico.

### **5.6 Extracción del Orlistat.**

Se vaciaron 15 cápsulas de Xenical® (120 mg de orlistat por cada una) en un vaso de precipitados de 100 mL; se le agregaron 35 mL de metanol y se mantuvo en agitación constantemente durante 5 minutos. Posteriormente se filtró por medio de un embudo de tallo corto y papel filtro (whatman grado 52), el filtrado se colocó en un matraz bola de 250 mL. El metanol se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio y se obtuvo un aceite, al cual se le agregaron 25 mL de agua destilada fría ( $10^{\circ}\text{C}$ ). Se dejó reposar durante 30 minutos. Finalmente se formó un precipitado color blanco, el cual fue filtrado y lavado con agua destilada fría ( $10^{\circ}\text{C}$ ). Se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó en un vial color ámbar. El rendimiento fue del 95%.

## 5.7 Ensayos in vivo.

### 5.7.1 Modelo animal de obesidad.

Noventa ratas Wistar machos se dividieron en dos grupos: **1) Dieta de cafetería** (Grupo CF;  $n=84$ , seis animales/caja) y **2) Dieta balanceada** (Grupo B;  $n=6$ ). El grupo CF recibió una dieta de cafetería durante 77 días. Mientras que el grupo B recibió durante el mismo tiempo alimento balanceado comercial (Prats *et al.*, 1989; Lladó *et al.*, 1995).

### 5.7.2 Componentes de las dietas.

La dieta de cafetería empleada en este trabajo fue una modificación a la descrita por Prats *et al.*, (1989) e incluyó diversos alimentos mexicanos. La dieta del grupo CF incluyó alimento balanceado comercial (Teklad Global Rodent Diets, Harlan), tocino (Kir<sup>®</sup>), cacahuates salados (Mafer Premium<sup>®</sup>), papas fritas (Sabritas<sup>®</sup>), galletas (Chokis<sup>®</sup>, Gamesa), queso tipo manchego (Alpura<sup>®</sup>), barras de chocolate (Abuelita<sup>®</sup>, Nestlé), pan dulce, pan bolillo, tortillas de maíz, zanahorias y sacarosa al 25%.

La dieta del grupo S consistió en agua y alimento balanceado comercial (Teklad Global Rodent Diets, Harlan). Las dietas se prepararon diariamente y se colocaron dentro de un contenedor metálico. Para el caso de la dieta de cafetería los ingredientes fueron cortados y mezclados en pequeños pedazos (Cuadro 7). Todos las ratas tuvieron acceso a las dietas correspondientes *ad-libitum*.

**Cuadro 7.** Contenido energético y composición de la dieta de cafetería\*.

<b>Alimento (100 g)</b>	<b>Energía (kcal)</b>	<b>Proteínas (g)</b>	<b>Carbohidratos (g)</b>	<b>Lípidos (g)</b>
Tocino fresco	655	4.1	0.0	71.0
Cacahuates salados	572	24.0	20.0	44.0
Papas fritas	528	4.0	56.0	32.0
Galletas	504	5.6	68.0	21.3
Queso tipo manchego	485	5.3	4.4	40.3
Chocolate	451	3.2	78.0	14.0
Pan dulce	445	7.9	48.3	24.5
Pan bolillo	309	9.2	65.2	0.4
Tortillas de maíz	224	5.8	49.5	1.1
Zanahorias	51	0.3	12.3	0.3
Alimento balanceado comercial	320	23.9	50.8	4.4
Sacarosa	384	0.0	99.1	0.0
<b>Total</b>	<b>4928</b>	<b>93.3</b>	<b>551.6</b>	<b>253.3</b>

\*Los valores nutricionales fueron tomados de las etiquetas de cada alimento.

### **5.7.3 Evaluación del consumo de alimento.**

Los animales se colocaron periódicamente en jaulas metabólicas individuales, para determinar la cantidad de alimento y agua consumidos durante 24 horas (Prats *et al.*, 1985). Brevemente, diez g de cada alimento (en total 110 g) se cortaron en pequeños pedazos, mezclados y colocados en un contenedor metálico, dentro de cada jaula metabólica, a fin de permitir la recolección del alimento sobrante después de 24 horas. El consumo de sacarosa se calculó restando la cantidad inicial (300 mL) menos el volumen del líquido restante contenido en las botellas después de 24 horas. El grupo B recibió 110 g de alimento balanceado comercial y 300 mL de agua. Se incluyeron controles para el cálculo de agua evaporada en ambos casos y poder realizar la corrección correspondiente.

La cantidad consumida de alimento por animal, se calculó por diferencia entre la cantidad de alimento proporcionada y la cantidad recuperada al día siguiente (Prats *et al.*, 1985; Lladó *et al.*, 1995). El contenido de energía de cada alimento se calculó usando las siguientes consideraciones: los lípidos aportan 9 Kcal/g, las proteínas aportan 4 Kcal/g y los carbohidratos aportan 4 Kcal/g (Bender, 2009).

### **5.7.4 Administración de tratamientos.**

Los extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis*, se suspendieron con Tween 80 al 0.5% y se administraron oralmente empleando una cánula intragástrica a las dosis de 10, 30 ó 100 mg/kg. Un grupo CF y uno B se incluyeron como controles en cada experimento. La sibutramina (5 y 10 mg/kg) se usó como fármaco de referencia. Los tratamientos se administraron diariamente a las 17:00 hr, una hora antes del comienzo del ciclo de oscuridad. La administración de los extractos y vehículo (Tween 80) se realizó durante 35 días consecutivos.

### **5.7.5 Evaluación de los extractos de *Hypericum* sobre el peso corporal y consumo de alimento.**

Después de 77 días, los animales alimentados con la dieta de cafetería presentaron un incremento de peso corporal de 24.6% respecto al grupo control. Por esta razón los tratamientos se empezaron a administrar a partir del día 77. Los grupos controles (CF y B) recibieron el mismo volumen de vehículo (Tween 80). El peso corporal se registró semanalmente. Al final del tratamiento los animales se colocaron dentro de una jaula metabólica para medir su consumo de alimento, el procedimiento se explicó en la sección 5.7.3.

Los animales se dividieron en diferentes grupos como se muestra en el cuadro 8. El número de animales se determinó estadísticamente empleando un diseño de 3 factores (tratamiento, dosis y planta). Además, el número de animales en cada grupo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL).

**Cuadro 8.** Asignación azarosa de los animales de experimentación.

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>n</b>
Grupo 01	Dieta balanceada + Tween 80	No aplica	6
Grupo 02	Dieta de cafetería + Tween 80	No aplica	6
Grupo 03	Dieta de cafetería + Sibutramina	5 ó 10	3
	<b>Dieta de cafetería + <i>H. silenoides</i></b>		
Grupo 04 al 06	Extracto hexánico	10, 30 ó 100	3
Grupo 07 al 09	Extracto diclorometánico	10, 30 ó 100	3
Grupo 10 al 12	Extracto metanólico	10, 30 ó 100	3
Grupo 13 al 15	Extracto acuoso	10, 30 ó 100	3
	<b>Dieta de cafetería + <i>H. philonotis</i></b>		
Grupo 16 al 18	Extracto hexánico	10, 30 ó 100	3
Grupo 19 al 21	Extracto diclorometánico	10, 30 ó 100	3
Grupo 22 al 24	Extracto metanólico	10, 30 ó 100	3
Grupo 25 al 27	Extracto acuoso	10, 30 ó 100	3

#### **5.7.6 Evaluación del efecto antidepressivo de los extractos de *Hypericum*.**

Este experimento se realizó a los treinta días de iniciados los tratamientos (*Hypericum*, sibutramina o vehículo), empleando la prueba de nado forzado según el método descrito por Porsolt *et al.*, (1977) con ligeras modificaciones. Brevemente, 1 hora después de la administración *p.o.* de los tratamientos; las ratas fueron obligadas a nadar individualmente en un cilindro de plástico (42 cm de alto x 33 cm de diámetro) con 35 cm de agua a 25±1°C. La duración total de inmovilidad (segundos) se midió durante los últimos cuatro minutos de una sesión total de seis min. Las ratas se consideraron inmóviles cuando el animal no hizo más intentos por escapar, excepto los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua.

#### **5.7.7 Evaluación del efecto hipolipidémico e hipoglucemiante de los extractos de *Hypericum*.**

Muestras sanguíneas se recogieron al finalizar los respectivos tratamientos. Después de un ayuno de 12 h, los animales se anestesiaron con éter. Aproximadamente, 5 mL de sangre se obtuvieron de la vena femoral y se centrifugaron a 2400 rpm durante 15 minutos, el suero se separó para su análisis. La glucosa, colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y el índice aterogénico (IA) se analizaron por el Laboratorio Clínico Universitario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES Zaragoza UNAM), utilizando un aparato Reflotron<sup>®</sup> Plus (Roche, LABSSA, SA de CV, México D.F., México).

### **5.7.8 Evaluación de los extractos de *Hypericum* sobre tejido adiposo y no adiposo.**

Después de 35 días de tratamiento y un ayuno de 12 h, los animales se anestesiaron con éter. Se extirparon los tejidos adiposos (TAB y TAP) y no adiposos (corazón, hígado, riñones y músculo del abdomen). Los tejidos se pesaron y congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Thermo Scientific Revco<sup>®</sup> Value Series Modelo ULT390-3-A35) hasta su análisis. Muestras de materia fecal se colectaron durante las últimas 24 horas del experimento. Las muestras fecales se secaron, pesaron y finalmente se pulverizaron. El polvo se guardó en frascos de vidrio a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

La extracción de grasas del tejido adiposo y no adiposo, se realizó empleando el método descrito por Folch *et al.*, 1957. Brevemente, un gramo de tejido se colocó dentro de un tubo de vidrio, 10 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) se agregaron al tubo de vidrio. Las muestras se homogeneizaron durante 3 minutos (Ultra-Turrax modelo S18N-19G), posteriormente se centrifugaron a 2400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró con vacío y se agregaron 3 mL de NaCl al 1%. El tubo de vidrio se centrifugó a 2400 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se removió empleando una pipeta Pasteur. El cloroformo se evaporó empleando vacío y finalmente se determinó el peso de las grasas de cada tejido.

### **5.7.9 Identificación de ácidos grasos por CG-EM.**

Se emplearon las grasas extraídas por el Método de Folch (Sección 5.7.8), provenientes de animales tratados con el extracto acuoso de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg. Brevemente, 20 mg de grasa se colocaron individualmente dentro de un tubo de vidrio junto con 4 mL de KOH al 5%. Posteriormente los tubos se colocaron en un Baño María a  $80^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Las muestras se neutralizaron con HCl al 15%, posteriormente los ácidos grasos libres se extrajeron con 4 mL de éter. La fase acuosa se desechó y la fase etérea se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Finalmente se incorporaron 10 mL de solución saturada de diazometano para la metilación de los ácidos grasos libres. Controles de tejidos de animales tratados con dieta de cafetería o dieta balanceada se incluyeron. Las muestras se enviaron a cromatografía de gases para su análisis.

Las grasas hidrolizadas y metiladas se analizaron empleando un cromatógrafo de gases LECO modelo Pegasus 4D acoplado a un espectrómetro de gases marca Agilent modelo 6890N con un inyector automático Agilent modelo T5606-01. Un  $\mu\text{L}$  de la muestra se inyectó en una columna Capilar Fase DB5 de Agilent (10 m X 0.18 mm de diámetro interno; espesor de película 0.18 mm). Se utilizó Helio como gas acarreador a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La temperatura del inyector fue de  $300^{\circ}\text{C}$ , la temperatura de la línea de transferencias de  $250^{\circ}\text{C}$  y la temperatura de la cámara de  $200^{\circ}\text{C}$ . El retraso de

encendido del filamento fue de 100 segundos. El programa de calentamiento utilizado: temperatura inicial de 40°C durante 3 minutos, la velocidad de calentamiento de 50°C por minuto hasta 300°C durante 10 minutos. El intervalo de masa detectado fue de 45-550 U. La adquisición espectral fue de 10 espectros por segundo. La inyección se realizó con división de flujo (split). La técnica utilizada fue de baja resolución por impacto electrónico y detección de iones positivos. Una mezcla de hidrocarburos alifáticos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) en hexano, se inyectó bajo las condiciones previamente descritas, para calcular los índices de retención (índice de Kovats) de cada compuesto. El análisis se repitió por triplicado. Los datos se colectaron usando el software HP3398A GC Chemstation (Rev. A.01.01; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). La identificación de los compuestos encontrados por CG-EM se realizó por la comparación del índice de Kovats (RI) y por el espectro de masas reportado en las bases de datos NIST 08 y en la literatura (Adams, 1989).

#### **5.7.10 Efecto de *H. silenoides* sobre adipocitos blancos y pardos.**

Una muestra de 1 cm<sup>3</sup> de tejido adiposo blanco se cortó en un criostato (Clinicut<sup>®</sup> modelo 60) a -35°C. El espesor de los cortes fue de 15 µm. La inclusión de los tejidos se realizó en un portaobjetos cubierto de gelatina, posteriormente las muestras se fijaron con vapores de formaldehído al 37% durante 4 minutos. Los porta objetos se lavaron con agua destilada durante 3 minutos. Los cortes se tiñeron con 2 mL de solución de trabajo del colorante rojo aceitoso O<sup>2</sup> durante 5 minutos. El exceso de colorante se eliminó con agua destilada. Posteriormente 2 mL de hematoxilina de Harris se agregaron al porta objeto durante 3 minutos, para teñir el núcleo del adipocito. El colorante se eliminó con agua de la llave. Los porta objetos se secaron a temperatura ambiente. Para el tejido adiposo pardo se repitió el mismo procedimiento. Muestras de TAB y TAP de animales tratados con dieta de cafetería o dieta balanceada se incluyeron. Veinte preparaciones se realizaron por animal.

Para el montaje de las preparaciones para microscopia se siguió el método descrito por Kaiser (Lynch, 1972). Brevemente, 100 mL de gelatina glicerizada se fundieron en un Baño María a 60 °C. El montaje del tejido adiposo tuvo lugar goteando aproximadamente 0.5 mL del medio de montaje con una varilla de vidrio sobre el portaobjetos en posición horizontal, se colocó encima cuidadosamente un cubreobjetos

---

<sup>2</sup> ***Preparación del colorante rojo aceitoso O.***

Solución madre: 300 mg del colorante rojo aceitoso O se disolvieron en 100 mL de isopropanol (99%).

Solución de trabajo: 3 partes de la solución madre + 2 partes de agua se mezclaron en un frasco color ámbar. La solución se dejó reposar durante 10 minutos y se filtró minutos antes de su uso. Esta solución solo es útil en un lapso de 2 a 4 horas.

limpio de manera que no quedaran burbujas de aire. Finalmente, la preparación se colocó en posición horizontal durante 30 minutos para su solidificación y sellada con barniz transparente.

Los cortes histológicos montados en gelatina glicerina se observaron en un microscopio (Labomed, modelo LX500) con el objetivo 10X. Treinta fotografías se tomaron en blanco-negro empleando una cámara fotográfica Canon modelo Power Shot A640 (tiempo de exposición 1/1,250, longitud focal 29.2). Las fotografías se convirtieron a sistema binario empleando el software libre Gimp System versión 2.6, finalmente el análisis espacial se desarrolló empleando el programa de computo SIG-GRASS versión 6.0.

### **5.8 Ensayo *in vitro*. Efecto de *Hypericum* sobre la inhibición de lipasa pancreática porcina.**

El procedimiento descrito por Lee *et al.*, (1993) se utilizó. Las siguientes soluciones se mezclaron en una microplaca (en estricto orden): 10 µl de palmitato de p-nitrofenilo (5.6 mg se disolvieron en 1.6 mL de acetonitrilo y se aforó a 5 mL con etanol para obtener una concentración final de 3 mM), 162 µl de solución amortiguadora Tris-HCl (75 mM, pH=8.5), 16 µl del extracto en evaluación y 12 µl lipasa pancreática porcina tipo II (5 mg/mL en solución amortiguadora Tris-HCl 75 mM). La mezcla se incubó a 37°C durante 25 minutos y la absorbancia se determinó a 405 nm (BIO-RAD modelo 680). Los extractos acuoso y metanólico se disolvieron en agua, mientras que los extractos de hexano y diclorometano en dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones finales de los extractos fueron: 3, 30, 100, 300 y 562 µg/mL. Un blanco y un control se incluyeron por cada concentración de cada extracto evaluado. El orlistat se empleó como fármaco de referencia a las concentraciones 0.024, 0.08, 0.24, 0.8 y 2.4 µg/mL.

### **5.9 Composición química de *H. silenoides* e *H. philonotis* empleando HPLC.**

El análisis químico de las muestras vegetales se llevó a cabo usando las condiciones cromatográficas de la monografía para *H. perforatum* (USP 30). Se prepararon las siguiente soluciones:

**Soluciones de referencia (quercetina, ácido clorogénico, hiperforina, hipericina, pseudohipericina y rutina):** Se disolvió 1 mg de cada uno de los estándares en una mezcla metanol:acetona (1:1) para obtener una solución con una concentración de 1 mg/mL.

**Soluciones de prueba:** Veinte cápsulas de *H. perforatum* se vaciaron en un vaso de precipitados de 100 mL. Posteriormente 1 g de la muestra se colocó en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador protegido de la luz; se agregaron 50 mL de una mezcla de metanol:acetona (1:1) y una barra magnética. Se calentó a 60 °C durante dos horas, con agitación constante. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pasó a través de papel filtro a un matraz volumétrico de 50 mL. Se lavó el matraz y el residuo del filtro con la mezcla. Se aforó con los lavados. La solución se filtró empleando una membrana

de teflón con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Finalmente el filtrado se inyectó al cromatógrafo de líquidos. El mismo procedimiento se realizó a 10 g de las partes aéreas de *H. silenoides* e *H. philonotis*. Las extracciones se realizaron por triplicado.

Para el caso de los extractos acuosos de ambas plantas, 25 mg del extracto se pesaron y colocados en un matraz de 25 mL, posteriormente 10 mL de una mezcla de metanol:agua (9:1) se adicionaron. La muestra se sonicó durante 10 minutos. Posteriormente se aforó a volumen y se mezcló. La solución se filtró empleando una membrana de teflón con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Finalmente la muestra se inyectó al cromatógrafo de líquidos.

**Equipo HPLC.** El sistema cromatográfico consistió de una bomba Waters Delta 600 (Milford, MA, USA), un inyector Waters 717 Plus, un controlador automático de gradientes Waters 600, un detector UV con arreglo de fotodiodos Waters 2996 en un rango de 200-400 nm ( Milford, MA, USA) y una estación computarizada para el procesamiento de datos equipada con el software Waters Empower 5.0.

**Condiciones cromatográficas.** Se empleó una columna Symmetry<sup>®</sup> C18 columna (4.6X250 mm diámetro interno 5 mm, Waters, Irlanda). Diez  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min. La columna se mantuvo a una temperatura de 30°C. Después de equilibrar con solución A al 100%, se programó el cromatógrafo para suministrar una elución por gradiente lineal (Cuadro 9). La longitud de onda de la lectura fue de 270 nm.

**Cuadro 9.** Gradiente de elución programado para el análisis en HPLC (USP, 30).

Solución A: ácido fosfórico (0.3%), solución B: acetonitrilo y solución C: metanol.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Solución C (%)
0-10	100 – 85	0 – 15	0
10-30	85 – 70	15 – 20	0 – 10
30-40	70 – 10	20 – 75	10 – 15
40-55	10 – 5	75 – 80	15
55-56	5 – 100	80 – 0	15 – 0
56-66	100	0	0

La identificación de los compuesto encontrados por HPLC, se realizó a través de la comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) con los obtenidos de los compuestos de referencia.

### **5.10 Evaluación de la quercetina, ácido clorogénico y rutina en el modelo *in vitro*.**

Se utilizó el método basado en la hidrólisis del palmitato de p-nitrofenilo (Sección 5.8). Los compuesto se disolvieron en etanol y las concentraciones evaluadas estuvieron dentro del rango de 0.3-300 µg/mL. Un blanco y un control (orlistat) se incluyeron por cada compuesto evaluado.

### **5.11 Identificación de compuestos del aceite esencial.**

Los aceites esenciales de *H. silenoides* e *H. philonotis* se analizaron usando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector de ionización de llama (FID). Los componentes volátiles se separaron empleando una columna capilar DB5 (5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 0.18 mm de diámetro interno; 0.18 µm espesor de película, J & W Scientific, Folsom, CA, USA), con el siguiente programa de calentamiento: temperatura inicial de 40°C durante 3 minutos, la velocidad de calentamiento de 10°C por minuto hasta 300°C, durante 15 minutos. El tiempo total del experimento fue de 44 minutos. La temperatura del inyector y la línea de transferencia fue de 300°C. El gas acarreador fue Helio a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min; se inyectó 1 µL de la muestra. La inyección se realizó con división de flujo (split) 1:75. Una mezcla de hidrocarburos alifáticos (C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>) (Sigma) en hexano, se inyectó bajo las condiciones previamente descritas, para calcular los índices de retención (índice de Kovats) de cada componente. El análisis se repitió por triplicado. Los datos se colectaron usando el software HP3398A GC Chemstation (Rev. A.01.01; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

La CG-EM se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LECO 4D TOF (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA), una columna DB5 (5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 0.18 mm diámetro interno.; 0.18 µm de espesor de película, J & W Scientific, Folsom, CA, USA), usando el anterior programa de temperatura. La temperatura de la línea de transferencia y del inyector fue de 250°C. El gas acarreador fue Helio (1 mL/min). Split ratio 1:75. El rango de masas adquirido fue de 45-600 *m/z*. Todos los espectros se adquirieron por impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV. Las muestras de aceite esencial se diluyeron 1:100 en *n*-hexano y 1 µL de la muestra se inyectó.

La identificación de los compuestos encontrados por CG-EM se realizó por la comparación del índice de Kovats (RI) y por el espectro de masas reportado en la base de dato NIST 08 y en la literatura (Adams, 1989). Los índices de retención se determinaron de acuerdo a van den Dool, 1963 usando *n*-alcanos como estándares.

## VII. RESULTADOS.

### 7.1 Ensayos in vivo.

#### 7.1.1 Modelo de obesidad.

Después de 77 días de administrar las dietas, el peso corporal del grupo CF fue de  $476 \pm 22$  g mientras que los animales del grupo B pesaron  $382 \pm 19$  g (Figura 6); los animales presentaron un exceso de peso corporal del 24.6% respecto al grupo B (Gráfica 1).

**Figura 6.** Modelo de obesidad dietética.

Animal alimentado con una dieta de cafetería (izquierda) durante 77 días.

Animal alimentado con dieta balanceada (derecha) durante 77 días.



La dieta de cafetería incrementó significativamente la ingesta de alimentos y la ganancia de peso en los animales del grupo CF. Adicionalmente, incrementó la eficiencia alimenticia respecto al grupo alimentado con la dieta balanceada (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Peso corporal, ganancia de peso (GP), consumo de alimento (CA) y eficiencia alimenticia en ratas macho Wistar alimentadas con dieta balanceada o dieta de cafetería.

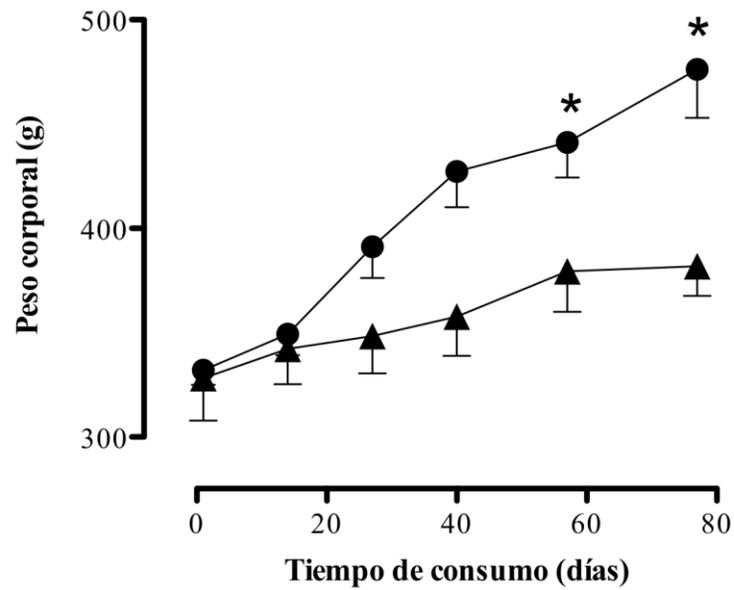
	<b>Dieta balanceada</b>	<b>Dieta de cafetería</b>
Peso corporal al día 0 (g)	328.2±20.3	332.2±6.9
Peso corporal al día 77 (g)	381.8±19.5	476.2±22.0 <sup>a</sup>
Ganancia de peso al día 77 (g)	53.6±9.7	144.2±17.3 <sup>a</sup>
Consumo de alimento al día 77 (g)	23.6±2.7	58.6±3.5 <sup>a</sup>
Eficiencia alimenticia (GP/CA)	2.3	2.5 <sup>a</sup>

Los valores representan la media ± EEM, de al menos seis animales.

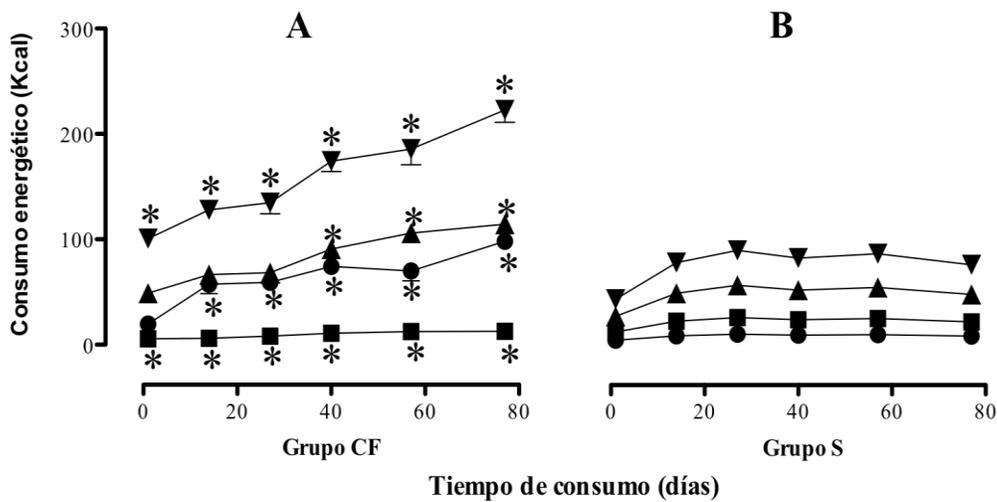
<sup>a</sup> $P < 0.05$  entre dieta balanceada y dieta de cafetería.

La dieta de cafetería consumida por los animales fue hipercalórica, hiperlipídica (Gráfica 2), hiperglucémica e hipoproteica. La gran cantidad de grasa consumida por los animales fue producto del alto consumo del tocino 9.38±0.49 g/día. Los demás constituyentes de la dieta fueron consumidos en el siguiente orden: zanahorias 8.78±1.22 g/día > pan dulce 4.33±0.52 g/día > pan bolillo 3.93±0.33 g/día > tortilla 3.63±0.98 g/día > queso manchego 3.48±0.67 g/día > cacahuates 3.05±0.89 g/día > papas fritas 1.33±0.33 g/día > pellet 0.95±0.28 g/día > galletas 0.93±0.33 g/día > chocolate 0.23±0.17 g/día.

La gráfica 2 muestra el total de energía consumida por día, adicionalmente se presentan las kcal provenientes de los lípidos, carbohidratos y proteínas, consumidos en la dieta de cafetería y en la dieta balanceada, los cálculos están basados en la cantidad de alimento consumido.



**Gráfica 1.** Incremento del peso corporal durante la administración de las dietas en ratas macho Wistar. Animales alimentados con una dieta balanceada (▲) y dieta de cafetería (●). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales. \*  $p < 0.05$ .



**Gráfica 2.** Consumo energético en kcal, durante la administración de una dieta de cafetería (A) o una dieta balanceada (B). Energía total consumida (▼), carbohidratos (▲), lípidos (●) y proteínas (■) consumidos. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales. \*  $p < 0.05$ .

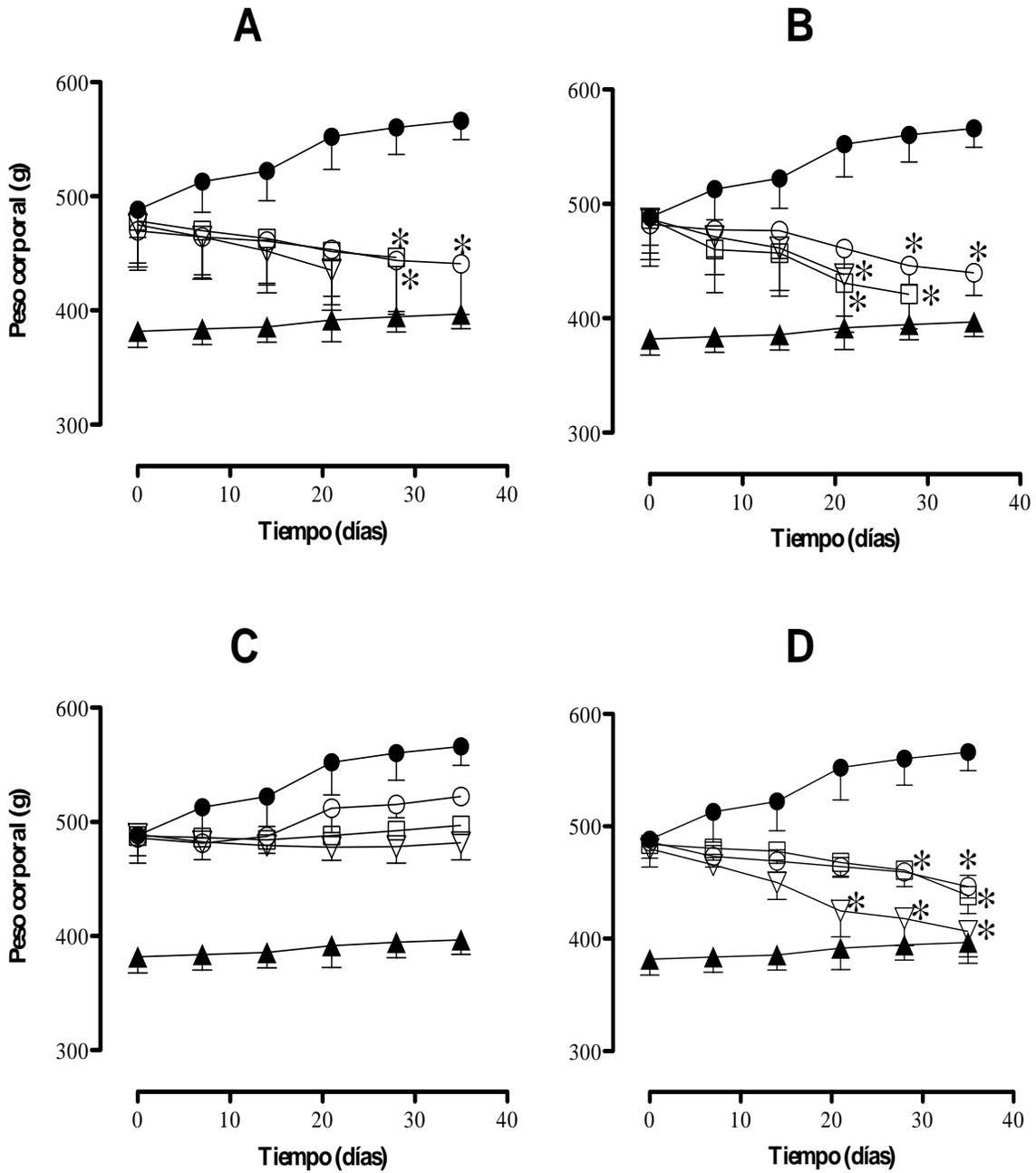
### 7.1.2 Efecto de los extractos de *Hypericum* sobre el peso corporal y el consumo de alimento.

Los extractos de *H. silenoides* reducen significativamente el peso corporal de los animales alimentados con una dieta de cafetería (Gráfica 3). Después de 35 días de tratamiento los extractos hexánico (10 mg/kg), diclorometánico (10 mg/kg) y acuoso (10, 30 y 100 mg/kg) de *H. silenoides* (Gráfica 3A, 3B y 3D); disminuyeron significativamente la ganancia de peso corporal respecto al grupo CF ( $p < 0.05$ ). Esta reducción de peso corporal se logró a pesar de haber continuado con la administración de la dieta de cafetería. En contraste el extracto metanólico no favoreció la pérdida de peso corporal ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, el peso corporal se mantuvo a lo largo de los 35 días de administración (Gráfica 3C); en otras palabras los animales no subieron de peso.

El orden de eficacia (reducción porcentual del peso corporal) obtenido con los extractos de *H. silenoides* fue: acuoso ( $15.4 \pm 5.2\%$ ) > diclorometano ( $8.7 \pm 1.5\%$ ) > hexano ( $6.4 \pm 3.0\%$ ) > metanol (no presentó efecto). Adicionalmente el extracto hexánico (30 y 100 mg/kg) y el diclorometánico (30 y 100 mg/kg) provocaron abundante diarrea grasa y una muerte prematura en los animales (Gráfica 3A y 3B). Agregando a lo anterior los animales tratados con el extracto hexánico presentaron Petequias, crecimiento del corazón (cardiomegalia), distensión e inflamación abdominal.

Por otro parte, la administración oral del extracto de diclorometano (10 y 30 mg/kg) y acuoso (30 y 100 mg/kg) de *H. philonotis* (Gráfica 4B y 4D) produjeron una reducción del peso corporal estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En contraste, el extracto metanólico no redujo el peso corporal, sin embargo su administración mantuvo el peso corporal de los animales a pesar de continuar con una dieta de cafetería (Gráfica 4C). El extracto hexánico de *H. philonotis* produjo efectos tóxicos e indujo la muerte de los animales a los 15 días de iniciado su administración (Gráfica 4A). Cabe mencionar que a lo largo de su administración los animales presentaron abundante diarrea grasa y piloerección.

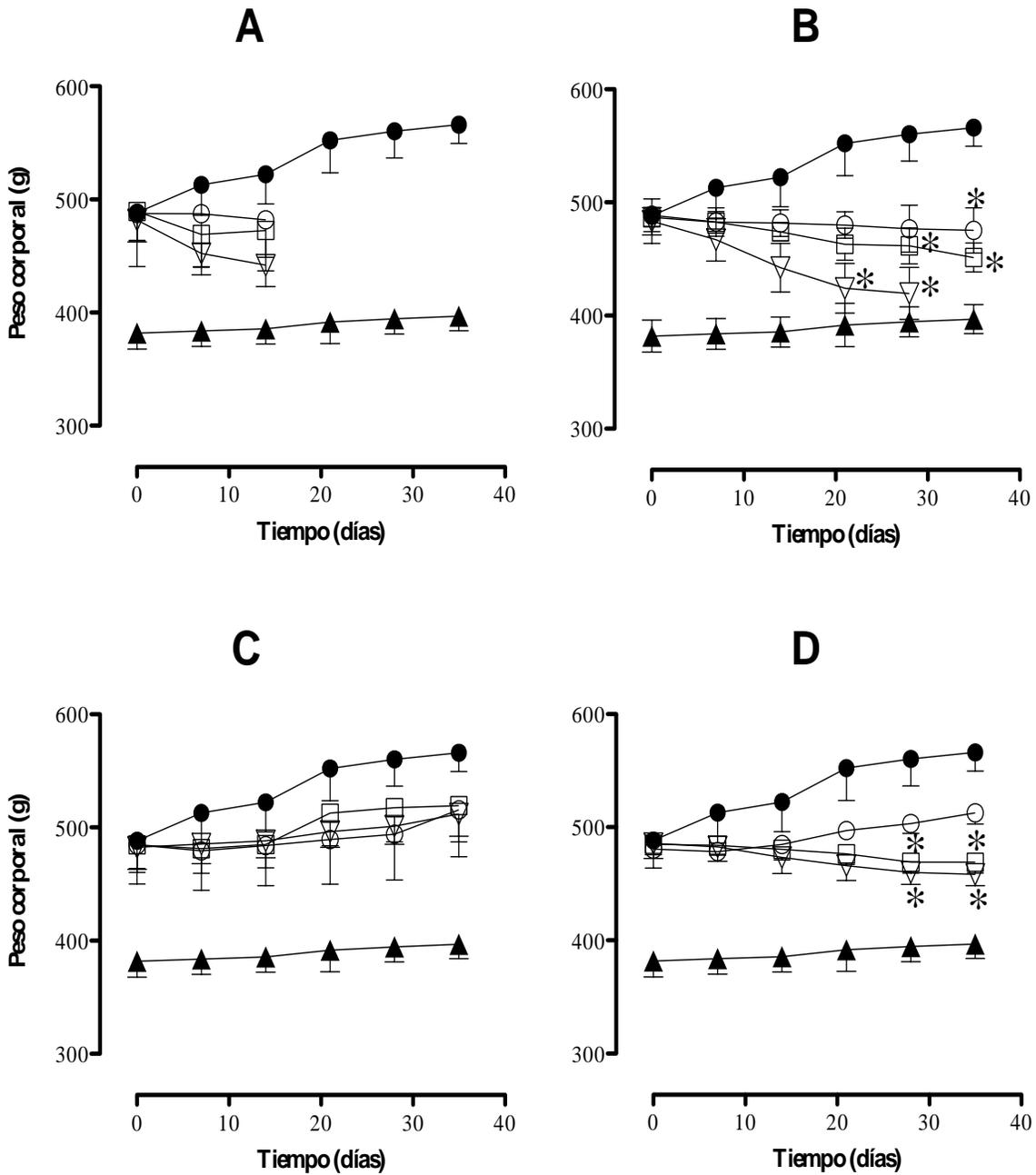
El orden de eficacia (reducción porcentual del peso corporal) obtenido con los extractos de *H. philonotis* fue: diclorometano ( $7.3 \pm 2.5\%$ ) > acuoso ( $5.6 \pm 1.0\%$ ) > metanol (no presentó efecto). En contraste, con la sibutramina a las dosis de 5 y 10 mg/kg disminuyó el peso corporal en un  $17 \pm 12.3\%$  y un  $18 \pm 9.9\%$  respectivamente (Gráfica 5).



**Gráfica 3.** Efecto de los extractos de *H. silenoides* (A) hexano, (B) diclorometano, (C) metanol y (D) acuoso sobre el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta de cafetería.

Grupo control dieta de cafetería+Tween 80 (●), 10 mg/kg (○), 30 mg/kg (□), 100 mg/kg (▽).

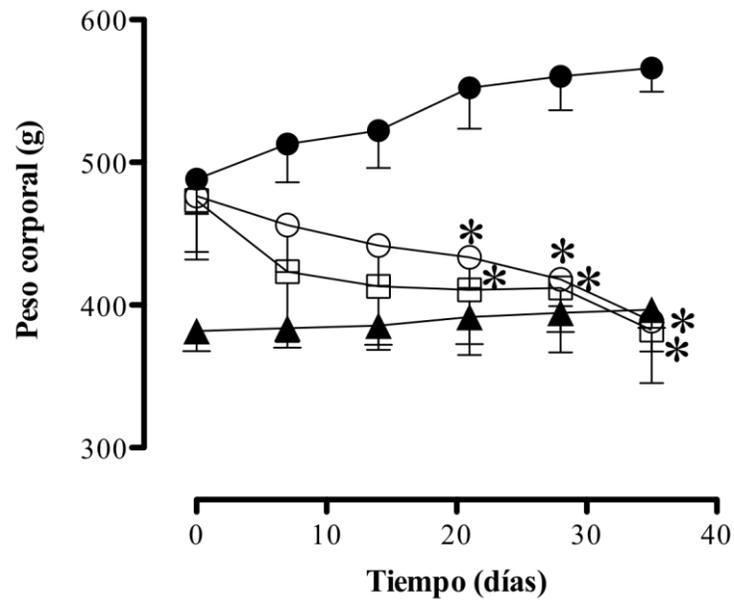
Grupo control dieta balanceada+Tween 80 (▲). Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres animales. \*p < 0.05.



**Gráfica 4.** Efecto de los extractos de *H. philonotis* (A) hexano, (B) diclorometano, (C) metanol y (D) acuoso sobre el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta de cafetería.

Grupo control dieta de cafetería+Tween 80 (●), 10 mg/kg (○), 30 mg/kg (□), 100 mg/kg (▽).

Grupo control dieta balanceada+Tween 80 (▲). Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres animales. \*  $p < 0.05$ .



**Gráfica 5.** Efecto de la sibutramina a las dosis de 5 mg/kg (○) y 10 mg/kg (□) sobre el peso corporal de ratas alimentadas con una dieta de cafetería.

Grupo control dieta de cafetería+Tween 80 (●) y grupo control dieta balanceada+Tween 80 (▲).

Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres animales.

\*  $p < 0.05$ .

La dieta de cafetería indujo hiperfagia en ratas macho Wistar ( $45.7 \pm 4.1$  g) vs dieta balanceada ( $21.6 \pm 1.0$  g). Mientras que la administración del extracto acuoso de *H. silenoides* presentó el mayor efecto anoréxico (-51.1% de consumo) seguido del extracto diclorometánico (-36.0% de consumo) y hexánico (-34.8% de consumo) (Cuadro 11).

En contraste el extracto diclorometánico de *H. philonotis* fue el único que disminuyó estadísticamente el consumo de alimentos en un -36.4%. El fármaco de referencia (sibutramina) disminuyó un 40% el consumo de alimentos (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Efecto anoréxico de *H. silenoides* e *H. philonotis*.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Consumo de alimentos (g)	Consumo de alimentos (%)
Dieta balanceada + Tween 80	No aplica	$21.6 \pm 1.0$	
Dieta de cafetería + Tween 80	No aplica	$45.7 \pm 4.1^a$	$111.8 \pm 19.1^a$
Dieta de cafetería + Sibutramina	5	$36.2 \pm 0.7^b$	$-21.0 \pm 1.4^b$
	10	$27.3 \pm 3.5^b$	$-40.3 \pm 7.7^b$
Dieta de cafetería + <i>H. silenoides</i>			
Extracto hexánico	10	$29.8 \pm 6.1^b$	$-34.8 \pm 13.4^b$
	30	+	+
	100	+	+
Extracto diclorometánico	10	$29.3 \pm 1.2^b$	$36.0 \pm 2.7^b$
	30	+	+
	100	+	+
Extracto metanólico	10	$40.5 \pm 5.3$	$-11.5 \pm 11.5$
	30	$39.8 \pm 3.6$	$-12.9 \pm 7.8$
	100	$39.1 \pm 5.3$	$-14.5 \pm 11.5$
Extracto acuoso	10	$32.0 \pm 3.8$	$-29.9 \pm 8.4$
	30	$30.1 \pm 4.3^b$	$-34.1 \pm 9.5^b$
	100	$22.3 \pm 1.2^b$	$-51.1 \pm 2.6^b$
Dieta balanceada + <i>H. philonotis</i>			
Extracto hexánico	10	+	+
	30	+	+
	100	+	+
Extracto diclorometánico	10	$42.2 \pm 2.5$	$-7.6 \pm 5.4$
	30	$29.1 \pm 5.7^b$	$-36.4 \pm 12.5^b$
	100	+	+
Extracto metanólico	10	$41.1 \pm 4.0$	$-10.0 \pm 8.7$
	30	$41.4 \pm 1.9$	$-9.4 \pm 4.1$
	100	$44.9 \pm 1.1$	$-1.9 \pm 2.3$
Extracto acuoso	10	$44.9 \pm 4.5$	$-1.8 \pm 9.9$
	30	$41.2 \pm 3.8$	$-9.9 \pm 8.2$
	100	$41.7 \pm 9.4$	$-8.8 \pm 16.7$

Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos tres observaciones.

<sup>a</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta balanceada.

<sup>b</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

+ = Muerte antes de finalizar el experimento.

### 7.1.3 Efecto antidepresivo de los extractos de *Hypericum*.

La dieta de cafetería ocasionó un incremento en la duración del tiempo de inmovilidad comparado con la dieta balanceada en el modelo de nado forzado (Cuadro 12). Solamente los extractos hexánico (10 mg/kg) y acuoso (30 y 100 mg/kg) de *H. silenoides* presentaron un efecto antidepresivo, es decir el tiempo de inmovilidad disminuyó significativamente en comparación con el grupo de animales tratados con dieta de cafetería ( $p < 0.05$ ). En contraste los extractos de *H. philonotis* no presentaron efecto antidepresivo. La sibutramina a las dosis de 5 y 10 mg/kg disminuyó el tiempo de inmovilidad  $63.8 \pm 32.3$  s y  $2.0 \pm 2.0$  s respectivamente (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Efecto antidepresivo de *H. silenoides* e *H. philonotis* en el modelo de nado forzado.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Inmovilidad (s)
Dieta balanceada + Tween 80	No aplica	94.5±14.9
Dieta de cafetería + Tween 80	No aplica	174.3±9.0 <sup>a</sup>
Dieta de cafetería + Sibutramina	5	63.8±32.3 <sup>b</sup>
	10	2.0±2.0 <sup>b</sup>
Dieta balanceada + <i>H. silenoides</i>		
Extracto hexánico	10	89.8±6.1 <sup>b</sup>
	30	+
	100	+
Extracto diclorometánico	10	174.6±2.4
	30	+
	100	+
Extracto metanólico	10	208.6±21.6
	30	184.8±15.8
	100	195.8±13.4
Extracto acuoso	10	146.2±17.1
	30	106.4±4.1 <sup>b</sup>
	100	103.6±9.0 <sup>b</sup>
Dieta balanceada + <i>H. philonotis</i>		
Extracto hexánico	10	+
	30	+
	100	+
Extracto diclorometánico	10	178.8±19.5
	30	187.6±24.2
	100	+
Extracto metanólico	10	131.6±23.8
	30	133.0±22.4
	100	184.8±17.2
Extracto acuoso	10	199.2±18.3
	30	188.6±9.8
	100	164.4±12.2

Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres observaciones.

<sup>a</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta balanceada. <sup>b</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

+ = Muerte antes de finalizar el experimento.

#### **7.1.4 Efecto hipolipidémico e hipoglucemiante de los extractos de *Hypericum*.**

La dieta de cafetería incrementó significativamente los niveles de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad (HDL) comparado con la dieta balanceada (Cuadro 13 y 14). En contraste el índice aterogénico (IA), la aspartato transaminasa (AST) y la alanino transaminasa (ALT) disminuyeron significativamente con la administración de la dieta de cafetería. Mientras que los niveles de glucosa y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) no mostraron cambio significativo ( $p>0.05$ ).

Los niveles de glucosa disminuyeron significativamente en los animales tratados con los extractos crudos de *H. silenoides*, el rango de disminución de este metabolito fue del 52.0% al 75.5% (Cuadro 13). El extracto que presentó la mayor actividad hipoglucémica fue el extracto acuoso a la dosis de 100 mg/kg. Adicionalmente este mismo extracto disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos y HDL; mientras que los parámetros plasmáticos LDL, IA, AST y ALT no fueron alterados significativamente ( $p>0.05$ ) (Cuadro 13). En otras palabras los extracto de *H. silenoides* presentaron actividad hipolipidémica.

Por otro lado los extractos diclorometánico, metanólico y acuoso de *H. philonotis* reducen significativamente los niveles de glucosa en un rango del 48% al 58% (Cuadro 14), lo que indicó que los extractos presentaron actividad hipoglucémica. En contraste el extracto metanólico de esta planta disminuyó los niveles de AST e incrementó los niveles de HDL-C y LDL-C significativamente. Agregando a lo anterior, el extracto acuoso disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de triglicéridos (Cuadro 14).

Los animales tratados con el fármaco de referencia (sibutramina) mostraron una disminución significativa de los niveles de glucosa (80.5%), sin embargo incrementaron los niveles de colesterol total, HDL y LDL (Cuadro 13 y 14).

**Cuadro 13.** Valores de la química sanguínea en ratas macho Wistar tratados con *H. silenoides*.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Índice aterogénico (IA)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Dieta balanceada + Tween 80	No aplica	109.0±10.0	42.3±4.4	77.2±7.6	28.7±2.8	4.3±1.0	1.48±0.03	305.0±42.5	133.0±14.74
Dieta de cafetería + Tween 80	No aplica	133.3±11.3	76.8±6.3 <sup>a</sup>	99.4±6.6 <sup>a</sup>	56.5±5.0 <sup>a</sup>	5.8±0.7	1.35±0.02 <sup>a</sup>	179.4±9.5 <sup>a</sup>	69.1±9.7 <sup>a</sup>
Dieta de cafetería + Sibutramina	5	139.0±15.5	110.0±9.1 <sup>b</sup>	87.3±4.8	76.0±6.1	12.7±2.3 <sup>b</sup>	1.43±0.03	311.3±14.3 <sup>b</sup>	132.3±22.3 <sup>b</sup>
	10	26.0±8.4 <sup>b</sup>	88.7±16.3	74.7±21.2 <sup>b</sup>	67.7±7.9 <sup>b</sup>	12.3±1.3 <sup>b</sup>	1.30±0.06	76.7±23.0	78.3±2.4
	10	52.0 2.9 <sup>b</sup>	55.3±5.8	80.0±7.2	51.0±7.8	6.0±1.2	1.13±0.18 <sup>b</sup>	240.7±21.9	74.0±11.6 <sup>b</sup>
Extracto hexánico	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracto diclorometánico	10	62.3± 4.5 <sup>b</sup>	77.0±5.3	110.7±15.1	58.7±3.8	10.3±1.2 <sup>b</sup>	1.33±0.03	111.3±21.0	52.3±1.3
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracto metanólico	10	37.0±25.2 <sup>b</sup>	118.0±13.4 <sup>b</sup>	100.7±13.4	84.0±13.4	20.0±3.0 <sup>b</sup>	1.43±0.09	14.0±6.0 <sup>b</sup>	100.3±9.0
	30	42.0±14.3 <sup>b</sup>	102.0±21.3	73.3±8.0	79.3±15.8	15.0±2.4 <sup>b</sup>	1.30±0.00	52.3±39.3 <sup>b</sup>	70.0±16.0
	100	96.3±10.7	94.3±4.7	102.3±17.0	71.3±2.7	11.0±3.0	1.30±0.00	172.0±78.3	67.7±15.0
Extracto acuoso	10	64.0±9.3 <sup>b</sup>	47.0±1.1 <sup>b</sup>	61.3±8.7 <sup>b</sup>	37.3±0.7 <sup>b</sup>	4.3±0.3	1.27±0.03	197.0±26.0	49.0±5.5
	30	55.3±15.3 <sup>b</sup>	86.7±3.3	89.3±21.3	64.0±7.0	9.3±0.7	1.40±0.10	109.3±6.0	160.0±81.0
	100	32.7±19.7 <sup>b</sup>	57.3±2.2	70.0±4.7	43.0±3.5	8.3±1.5	1.37±0.07	57.3±45.0	69.0±8.6

Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres observaciones.

<sup>a</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta balanceada. <sup>b</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

+ = Muerte antes de finalizar el experimento.

**Cuadro 14.** Valores de la química sanguínea en ratas macho Wistar tratados con *H. philonotis*.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	Índice aterogénico (IA)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Dieta balanceada + Tween 80	No aplica	109.0±10.0	42.3±4.4	77.2±7.6	28.7±2.8	4.3±1.0	1.48±0.03	305.0±42.5	133.0±14.74
Dieta de cafetería + Tween 80	No aplica	133.3±11.3	76.8±6.3 <sup>a</sup>	99.4±6.6 <sup>a</sup>	56.5±5.0 <sup>a</sup>	5.8±0.7	1.35±0.02 <sup>a</sup>	179.4±9.5 <sup>a</sup>	69.1±9.7 <sup>a</sup>
Dieta de cafetería + Sibutramina	5	139.0±15.5	110.0±9.1 <sup>b</sup>	87.3±4.8	76.0±6.1	12.7±2.3 <sup>b</sup>	1.43±0.03	311.3±14.3 <sup>b</sup>	132.3±22.3 <sup>b</sup>
	10	26.0±8.4 <sup>b</sup>	88.7±16.3	74.7±21.2 <sup>b</sup>	67.7±7.9 <sup>b</sup>	12.3±1.3 <sup>b</sup>	1.30±0.06	76.7±23.0	78.3±2.4
Extracto hexánico	10	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracto diclorometánico	10	96.3±24.4	84.0±10.4	104.0±23.6	59.3±6.6	11.3±4.4	1.45±0.04	49.7±16.4	173.0±79.0
	30	58.3±3.2 <sup>b</sup>	96.0±14.5	89.0±2.7	72.3±11.2	9.8±2.3	1.27±0.03	34.6±20.3 <sup>b</sup>	110.3±7.0
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Extracto metanólico	10	64.7±3.2 <sup>b</sup>	105.0±13.0	88.7±14.7	78.3±5.0 <sup>b</sup>	13.0±2.7 <sup>b</sup>	1.43±0.07	30.7±0.7 <sup>b</sup>	103.3±13.4
	30	69.0±16.0 <sup>b</sup>	78.3±0.9	82.0±12.1	58.0±1.0	9.7±1.8	1.47±0.12	136.0±59.2	112.3±10.5
	100	89.3±23.7	89.0±10.5	86.3±14.2	65.7±7.6	10.3±2.2	1.37±0.03	57.7±23.8	120.0±15.9
Extracto acuoso	10	48.3±17.6 <sup>b</sup>	58.7±4.4	68.7±3.0 <sup>b</sup>	46.7±4.0	5.3±0.3	1.27±0.03	129.0±56.0	54.3±4.7
	30	61.3±10.0 <sup>b</sup>	57.3±1.5	76.0±8.0	43.3±1.2	5.7±0.3	1.27±0.03	197.0±14.4	52.7±4.0
	100	56.0±15.0 <sup>b</sup>	89.5±11.5	70.5±3.5	66.5±4.5	10.5±4.5	1.35±0.05	243.5±47.5	51.5±10.5

Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres observaciones.

<sup>a</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta balanceada. <sup>b</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

+ = Muerte antes de finalizar el experimento.

### **7.1.5 Efecto de *H. silenoides* e *H. philonotis* sobre tejido adiposo y no adiposo.**

La dieta de cafetería incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) el tamaño de los tejidos adiposos y no adiposos estudiados: tejido adiposo blanco, tejido adiposo pardo, corazón, hígado, riñón y músculo (Cuadro 15 y 16). El porcentaje corporal del TAB y TAP incrementó 14.7% y 3.6% respectivamente, mientras que en los animales alimentados con una dieta balanceada el tejido adiposo blanco representó solo el 3% del peso corporal total, en cambio el tejido adiposo pardo estuvo ausente (Cuadro 15 y 16).

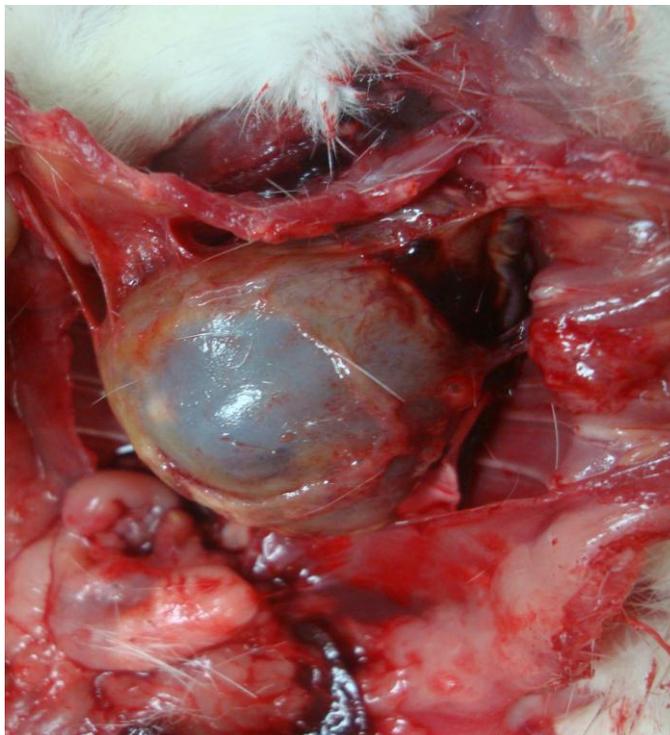
La dieta de cafetería, incrementó la cantidad de lípidos en tejidos no adiposos: corazón, hígado, riñón y músculo comparado con los animales alimentados con una dieta balanceada ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente, la cantidad de lípidos excretados en las heces incrementó significativamente en un 400% (Cuadro 15 y 16). Los animales alimentados con una dieta de cafetería presentaron 20.1% de lípidos totales, lo que corresponde a un 25.1% del peso corporal, esta condición puede ser comparada con una persona que presenta obesidad tipo 1 ( $IMC = 30 \text{ kg/m}^2$ ) (Ferrer-Lorente *et al.*, 2005). En contraste los animales alimentados con una dieta balanceada presentaron solo un 4.8% de tejido adiposo total (Cuadro 15 y 16).

El extracto acuoso de *H. silenoides* presentó la mayor actividad sobre los tejidos adiposos y no adiposos, en otras palabras actuó como un agente termogénico. Este extracto disminuyó significativamente el peso y el porcentaje corporal del TAB y TAP (Cuadro 15). Adicionalmente disminuyó la cantidad de lípidos presentes en el corazón, hígado, riñón y músculo, es decir la lipotoxicidad generada por la ingesta de una dieta de cafetería fue revertida significativamente por el extracto acuoso de *H. silenoides* (Cuadro 15).

El porcentaje de tejido adiposo total disminuyó en los animales tratados con algunos de los extractos crudos de *H. silenoides* ( $p < 0.05$ ). Los animales tratados con el extracto acuoso disminuyeron 78% la grasa corporal total, a diferencia del extracto diclorometánico que disminuyó la grasa solo en un 31.5% (Cuadro 15). Es importante señalar, que el extracto que presentó la mayor actividad termogénica fue el extracto acuoso, ya que el TAP disminuyó en un 74.3%. En contraste el extracto metanólico no favoreció la pérdida del tejido adiposo total (Cuadro 15).

Cabe señalar que los animales tratados con el extracto metanólico de *H. silenoides* presentaron problemas de tipo cardíaco. Estos animales incrementaron el tamaño del corazón ( $12.6 \pm 0.8 \text{ g}$ ) vs animales tratados con la dieta de cafetería. Agregando a lo anterior, durante el proceso de extracción del órgano en cuestión, la caja torácica se encontraba llena de un líquido transparente (Figura 7).

**Figura 7.** Crecimiento del corazón en animales tratados con el extracto metanólico de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg.



Por otro lado los extractos de diclorometano, metanol y acuoso de *H. philonotis* disminuyeron significativamente la cantidad del tejido adiposo blanco. El extracto acuoso presentó la mayor actividad termogénica al disminuir significativamente el tejido adiposo pardo (Cuadro 16). Sin embargo, *H. philonotis* no presentó actividad sobre la disminución de lípidos en los tejidos no adiposos ( $p > 0.05$ ). Adicionalmente, el porcentaje de tejido adiposo total disminuyó considerablemente en los animales tratados con los extractos crudos de *H. philonotis* (Cuadro 16).

Los animales tratados con sibutramina mostraron una disminución significativa en la cantidad de TAB y TAP. El tejido adiposo disminuyó en un 50% en comparación con los animales tratados con dieta de cafetería (Cuadro 15 y 16), en otras palabras la sibutramina presentó actividad termogénica.

**Cuadro 15.** Análisis de tejido adiposo y no adiposo de animales tratados con *H. silenoides*.

	Dieta	Dieta de	Sibutramina					Extracto			Extracto			Extracto		
	balanceada	cafetería	(mg/kg)					hexánico			diclorometánico			metanólico		acuoso
	+	+	5	10	10	30	100	10	30	100	10	30	100	(mg/kg)	(mg/kg)	
TAB peso (g)	11.88±2.27	83.27±11.54 <sup>a</sup>	23.73±5.17 <sup>b</sup>	16.47±2.83 <sup>b</sup>	30.8±18.1 <sup>b</sup>	+	+	33.0±3.8 <sup>b</sup>	+	+	38.8±5.6 <sup>b</sup>	37.0±5.4 <sup>b</sup>	32.5±1.3 <sup>b</sup>	30.0±3.4 <sup>b</sup>	26.6±2.2 <sup>b</sup>	16.3±3.3 <sup>b</sup>
(%) <sup>1</sup>	3.00±0.59	14.71±2.02 <sup>a</sup>	5.81±0.83 <sup>b</sup>	4.39±1.34 <sup>b</sup>	6.4±3.3 <sup>b</sup>	+	+	7.5±0.8 <sup>b</sup>	+	+	7.4±0.9 <sup>b</sup>	7.5±1.2 <sup>b</sup>	6.8±0.5 <sup>b</sup>	6.7±0.8 <sup>b</sup>	6.1±0.6 <sup>b</sup>	4.1±0.9
Lípidos (mg/g)	950.00±17.51	975.0±17.08 <sup>a</sup>	966.67±21.08 <sup>b</sup>	991.67±3.07 <sup>b</sup>	920.0±41.6	+	+	967.0±33.3	+	+	983.3±16.7	973.3±26.7	956.7±16.7	993.3±6.7	953.3±31.8	933.3±38.4
TAP (g)	0.00	20.57±2.43 <sup>a</sup>	7.10±0.33 <sup>b</sup>	4.70±1.64 <sup>b</sup>	9.4±2.6 <sup>b</sup>	+	+	15.1±1.8	+	+	14.1±3.0	13.3±2.1	10.0±1.1 <sup>b</sup>	9.2±2.1 <sup>b</sup>	12.2±1.5	5.3±1.5 <sup>b</sup>
(%) <sup>1</sup>	0.00	3.63±0.42 <sup>a</sup>	1.88±0.16 <sup>b</sup>	1.22±0.42 <sup>b</sup>	2.1±0.5	+	+	3.5±0.5	+	+	2.7±0.6	2.7±0.5	2.1±0.3	2.0±0.4	2.8±0.2	1.4±0.5 <sup>b</sup>
Lípidos (mg/g)	0.00	980.00±16.33 <sup>a</sup>	950.00±18.26 <sup>b</sup>	953.33±15.5 <sup>b</sup>	986.7±6.7	+	+	983.3±16.7	+	+	980.0±30.5	980.0±15.3	973.3±26.7	910.0±55.1	960±15.3	960.0±1.5 <sup>b</sup>
Corazón (g)	1.02±0.04	2.50±0.37 <sup>a</sup>	1.13±0.05 <sup>b</sup>	1.43±0.09 <sup>b</sup>	2.3±0.5	+	+	1.9±0.7	+	+	1.8±0.2	3.1±0.3	12.6±0.8 <sup>b</sup>	1.7±0.3	2.1±0.3	2.1±0.2
(%) <sup>1</sup>	0.25±0.02	0.45±0.05 <sup>a</sup>	0.30±0.00 <sup>b</sup>	0.33±0.02 <sup>b</sup>	0.5±0.1	+	+	0.4±0.1	+	+	0.34±0.04	0.62±0.06	2.6±0.1 <sup>b</sup>	0.40±0.06	0.50±0.07	0.51±0.03
Lípidos (mg/g)	93.33±3.33	225.00±16.28 <sup>a</sup>	216.70±5.57 <sup>b</sup>	186.7±13.82	166.7±34.8	+	+	253.3±38.4	+	+	256.7±48.1	210.0±10.0	270.0±45.1	213.3±29.6	173.3±16.7	113.3±4.8 <sup>b</sup>
Hígado (g)	8.13±0.36	12.32±0.41 <sup>a</sup>	11.30±0.42	8.86±0.05 <sup>b</sup>	10.3±1.1	+	+	10.7±0.3	+	+	11.1±1.1	12.2±1.0	10.9±1.4	9.3±0.5	10.5±1.8	9.6±1.1
(%) <sup>1</sup>	2.06±0.09	2.18±0.05	2.93±0.10 <sup>b</sup>	2.33±0.05	2.34±0.05	+	+	2.4±0.2	+	+	2.1±0.2	2.5±0.2	2.3±0.2	2.10±0.08	2.4±0.2	2.4±0.4
Lípidos (mg/g)	108.30±8.33	228.30±17.40 <sup>a</sup>	170.00±20.33 <sup>b</sup>	140.0±3.65 <sup>b</sup>	143.3±38.4	+	+	130.0±15.3	+	+	133.3±18.6	206.7±6.7	156.7±20.3	180.0±36.1	180.0±15.3	93.3±4.5 <sup>b</sup>
Riñón (g)	2.11±0.06	2.83±0.12 <sup>a</sup>	2.46±0.13 <sup>b</sup>	2.30±0.03 <sup>b</sup>	2.7±0.3	+	+	2.13±0.03	+	+	2.6±0.4	2.6±0.1	2.5±5	2.4±0.1	2.7±0.1	2.5±0.3
(%) <sup>1</sup>	0.53±0.02	0.50±0.02 <sup>a</sup>	0.63±0.02 <sup>b</sup>	0.60±0.00 <sup>b</sup>	0.63±0.06	+	+	0.50±0.03	+	+	0.50±0.08	0.52±0.02	0.52±0.09	0.54±0.02	0.63±0.04	0.6±0.1
Lípidos (mg/g)	145.00±12.58	306.70±38.96 <sup>a</sup>	366.7±25.65	190.00±10.95 <sup>b</sup>	266.7±26.0	+	+	223.3±58.4	+	+	286.7±31.8	366.7±33.3	246.7±37.6	223.3±0.5	186.7±34.8	133.3±46.3 <sup>b</sup>
Músculo (g)	14.02±1.05	23.97±0.45 <sup>a</sup>	15.53±0.38 <sup>b</sup>	18.87±2.92 <sup>b</sup>	16.5±2.3 <sup>b</sup>	+	+	18.3±1.3	+	+	18.0±4.3	19.5±2.2	19.4±1.0	18.3±1.5	17.3±1.2	19.0±2.2
(%) <sup>1</sup>	3.53±0.27	4.23±0.08 <sup>a</sup>	4.10±0.31	4.86±0.64 <sup>b</sup>	3.7±0.3	+	+	4.1±0.3	+	+	3.5±0.9	3.9±0.4	4.0±0.1	4.1±0.4	3.9±0.1	4.8±0.9
Lípidos (mg/g)	96.67±3.33	253.30±22.61 <sup>a</sup>	213.3±15.20 <sup>b</sup>	126.70±23.48 <sup>b</sup>	186.7±50.4	+	+	313.3±61.7	+	+	266.7±16.7	256.7±58.1	253.3±31.8	166.7±56.7	150.0±28.9	83.3±8.8 <sup>b</sup>
Heces (g)	3.10±0.3	1.5±0.2 <sup>a</sup>	1.2±0.1	1.2±0.2	1.5±0.3	+	+	0.93±0.1	+	+	0.93±0.07 <sup>b</sup>	1.6±0.1	0.9±0.1	1.9±0.5	1.2±0.2	1.2±0.1
(%) <sup>1</sup>	0.8±0.1	0.3±0.04 <sup>a</sup>	0.32±0.06	0.30±0.03	0.33±0.04	+	+	0.21±0.03	+	+	0.18±0.02	0.32±0.03	0.2±0.02	0.4±0.1	0.30±0.04	0.30±0.03
Lípidos (mg/g)	36.7±9.5	148.3±14.2 <sup>a</sup>	120.0±17.3	100.0±28.9	136.7±17.6	+	+	133.3±12.0	+	+	113.3±8.8	153.3±18.6	143.3±33.8	223.3±20.3	283.3±35.3 <sup>b</sup>	466.7±35.3 <sup>b</sup>
<b>Lípidos totales (%)</b>	<b>3.9±0.5</b>	<b>20.1±2.6<sup>a</sup></b>	<b>7.1±2.3<sup>b</sup></b>	<b>6.2±1.9<sup>b</sup></b>	<b>10.0±3.9<sup>b</sup></b>	+	+	<b>13.8±1.3<sup>b</sup></b>	+	+	<b>9.0±3.0<sup>b</sup></b>	<b>9.7±2.9<sup>b</sup></b>	<b>9.0±2.5<sup>b</sup></b>	<b>10.0±0.8<sup>b</sup></b>	<b>10.1±0.3<sup>b</sup></b>	<b>6.2±0.8<sup>b</sup></b>
<b>Tejido adiposo total (%)<sup>2</sup></b>	<b>4.8±0.7</b>	<b>25.1±3.2<sup>a</sup></b>	<b>8.9±2.9<sup>b</sup></b>	<b>7.8±2.4<sup>b</sup></b>	<b>12.5±4.9<sup>b</sup></b>	+	+	<b>17.2±1.6</b>	+	+	<b>11.2±3.7<sup>b</sup></b>	<b>12.2±3.6<sup>b</sup></b>	<b>11.3±3.1<sup>b</sup></b>	<b>12.5±1.0<sup>b</sup></b>	<b>12.6±0.4<sup>b</sup></b>	<b>7.7±1.0<sup>b</sup></b>

<sup>1</sup>(peso de tejido / peso corporal al día 35 de iniciado el tratamiento (planta, vehículo ó sibutramina).

<sup>2</sup>dado que el tejido adiposo tiene cerca del 80 % de lípidos (0.8g lípido/g tejido) se aplica este valor al lípido total para tener una estimación del contenido de tejido adiposo del animal completo (Ferrer-Lorente *et al.*, 2005).

<sup>a</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta balanceada.

<sup>b</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

+ = Muerte antes de finalizar el experimento. Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres observaciones.

**Cuadro 16.** Análisis de tejido adiposo y no adiposo de animales tratados con *H. philonotis*.

	Dieta balanceada	Dieta de cafetería	Sibutramina (mg/kg)			Extracto hexánico (mg/kg)			Extracto diclorometánico (mg/kg)			Extracto metanólico (mg/kg)			Extracto acuoso (mg/kg)	
	+ Tween 80	+ Tween 80	5	10	10	30	100	10	30	100	10	30	100	10	30	100
TAB peso (g)	11.88±2.27	83.27±11.54 <sup>a</sup>	23.73±5.17 <sup>b</sup>	16.47±2.83 <sup>b</sup>	+	+	+	30.5±9.2 <sup>b</sup>	25.2±8.9 <sup>b</sup>	+	29.1±5.2 <sup>b</sup>	30.3±16.2 <sup>b</sup>	30.1±8.7 <sup>b</sup>	40.6±5.2 <sup>b</sup>	35.1±4.4 <sup>b</sup>	32.5±7.5 <sup>b</sup>
(%) <sup>1</sup>	3.00±0.59	14.71±2.02 <sup>a</sup>	5.81±0.83 <sup>b</sup>	4.39±1.34 <sup>b</sup>	+	+	+	6.4±1.9 <sup>b</sup>	5.7±2.0 <sup>b</sup>	+	5.7±0.1 <sup>b</sup>	5.5±2.7 <sup>b</sup>	5.7±1.4 <sup>b</sup>	7.9±1.1 <sup>b</sup>	7.5±0.9 <sup>b</sup>	6.2±1.4 <sup>b</sup>
Lípidos (mg/g)	950.00±17.51	975.0±17.08 <sup>a</sup>	966.67±21.08 <sup>b</sup>	991.67±3.07 <sup>b</sup>	+	+	+	983.3±16.7	986.7±13.3	+	996.7±3.3	983.3±12.0	996.7±3.3	986.7±13.3	943.3±122.0	996.7±57.8
TAP (g)	0.00	20.57±2.43 <sup>a</sup>	7.10±0.33 <sup>b</sup>	4.70±1.64 <sup>b</sup>	+	+	+	10.9±0.6	15.4±5.6	+	10.7±1.8 <sup>b</sup>	13.5±4.4	9.5±1.5 <sup>b</sup>	12.0±1.1	9.1±1.3 <sup>b</sup>	8.8±0.7 <sup>b</sup>
(%) <sup>1</sup>	0.00	3.63±0.42 <sup>a</sup>	1.88±0.16 <sup>b</sup>	1.22±0.42 <sup>b</sup>	+	+	+	2.3±0.2	3.4±1.2	+	2.1±0.3	2.5±0.7	1.9±0.3	2.3±0.2	1.9±0.3	2.0±0.1
Lípidos (mg/g)	0.00	980.00±16.33 <sup>a</sup>	950.00±18.26 <sup>b</sup>	953.33±15.5 <sup>b</sup>	+	+	+	996.7±3.3	976.7±14.5	+	996.7±3.3	993.3±3.3	976.7±23.3	983.3±16.7	950.0±25.2	916.7±26.7
Corazón (g)	1.02±0.04	2.50±0.37 <sup>a</sup>	1.13±0.05 <sup>b</sup>	1.43±0.09 <sup>b</sup>	+	+	+	1.9±0.3	1.7±0.3	+	1.40±0.06	1.7±0.5	1.2±0.1 <sup>b</sup>	2.0±0.1	1.7±0.1	1.9±0.0
(%) <sup>1</sup>	0.25±0.02	0.45±0.05 <sup>a</sup>	0.30±0.00 <sup>b</sup>	0.33±0.02 <sup>b</sup>	+	+	+	0.40±0.08	0.40±0.07	+	0.30±0.01	0.33±0.07	0.23±0.01	0.40±0.03	0.40±0.04	0.41±0.01
Lípidos (mg/g)	93.33±3.33	225.00±16.28 <sup>a</sup>	216.70±5.57 <sup>b</sup>	186.7±13.82	+	+	+	256.7±29.6	210.0±10.0	+	133.3±33.3	196.7±33.3	203.3±26.0	220.0±17.3	183.3±21.9	176.7±26.7
Hígado (g)	8.13±0.36	12.32±0.41 <sup>a</sup>	11.30±0.42	8.86±0.05 <sup>b</sup>	+	+	+	10.1±1.1	11.5±2.2	+	11.3±1.2	11.1±0.8	9.6±0.9	9.9±0.3	8.9±0.5	9.5±1.8
(%) <sup>1</sup>	2.06±0.09	2.18±0.05	2.93±0.10 <sup>b</sup>	2.33±0.05	+	+	+	2.1±0.2	2.5±0.5	+	2.2±0.2	2.2±0.2	1.9±0.1	1.93±0.04	1.9±0.1	1.9±0.3
Lípidos (mg/g)	108.30±8.33	228.30±17.40 <sup>a</sup>	170.00±20.33 <sup>b</sup>	140.0±3.65 <sup>b</sup>	+	+	+	233.3±88.2	133.3±28.5	+	113.3±33.3	133.3±8.8	150.0±26.5	196.7±71.7	113.3±13.3	186.7±33.3
Riñón (g)	2.11±0.06	2.83±0.12 <sup>a</sup>	2.46±0.13 <sup>b</sup>	2.30±0.03 <sup>b</sup>	+	+	+	2.40±0.06	2.9±0.3	+	2.9±0.1	2.90±0.09	3.2±0.5	2.3±0.1	2.50±0.03	2.6±0.4
(%) <sup>1</sup>	0.53±0.02	0.50±0.02 <sup>a</sup>	0.63±0.02 <sup>b</sup>	0.60±0.00 <sup>b</sup>	+	+	+	0.51±0.01	0.63±0.06	+	0.60±0.04	0.56±0.05	0.6±0.1	0.45±0.02	0.53±0.01	0.5±0.1
Lípidos (mg/g)	145.00±12.58	306.70±38.96 <sup>a</sup>	366.7±25.65	190.00±10.95 <sup>b</sup>	+	+	+	196.7±60.6	203.3±26.0	+	166.7±66.7	356.6±14.5	316.7±87.6	260.0±5.8	193.3±48.4	226.7±16.7
Músculo (g)	14.02±1.05	23.97±0.45 <sup>a</sup>	15.53±0.38 <sup>b</sup>	18.87±2.92 <sup>b</sup>	+	+	+	14.7±0.3 <sup>b</sup>	14.5±0.8 <sup>b</sup>	+	18.7±1.5	19.6±0.2	16.3±1.5 <sup>b</sup>	18.4±1.4	20.2±0.6	19.2±3.8
(%) <sup>1</sup>	3.53±0.27	4.23±0.08 <sup>a</sup>	4.10±0.31	4.86±0.64 <sup>b</sup>	+	+	+	3.10±0.06	3.2±0.2	+	3.6±0.2	3.8±0.2	3.2±0.2	3.6±0.2	4.3±0.1	3.9±0.6
Lípidos (mg/g)	96.67±3.33	253.30±22.61 <sup>a</sup>	213.3±15.20 <sup>b</sup>	126.70±23.48 <sup>b</sup>	+	+	+	310.0±58.6 <sup>b</sup>	170.0±15.3	+	166.7±33.3	196.7±41.0	280.0±90.7	273.3±13.3	240.0±45.1	203.3±73.3
Heces (g)	3.10±0.3	1.5±0.2 <sup>a</sup>	1.2±0.1	1.2±0.2	+	+	+	1.5±0.2	1.2±0.1	+	1.0±0.03	1.3±0.2	1.3±0.1	0.8±0.2	1.4±0.1	1.2±0.2
(%) <sup>1</sup>	0.8±0.1	0.3±0.04 <sup>a</sup>	0.32±0.06	0.30±0.03	+	+	+	0.31±0.05	0.27±0.02	+	0.20±0.02	0.5±0.02	0.25±0.03	0.16±0.04	0.30±0.02	0.28±0.04
Lípidos (mg/g)	36.7±9.5	148.3±14.2 <sup>a</sup>	120.0±17.3	100.0±28.9	+	+	+	123.3±23.3	150.0±28.9	+	106.7±8.8	150.0±25.2	163.3±13.3	133.3±33.3	126.7±37.1	143.3±29.1
<b>Lípidos totales (%)</b>	<b>3.9±0.5</b>	<b>20.1±2.6</b>	<b>7.1±2.3</b>	<b>6.2±1.9</b>	+	+	+	<b>10.7±2.3<sup>b</sup></b>	<b>8.4±3.5</b>	+	<b>9.1±1.1</b>	<b>7.5±3.6</b>	<b>7.9±2.0</b>	<b>9.5±3.0</b>	<b>8.8±2.7<sup>b</sup></b>	<b>8.1±2.8<sup>b</sup></b>
<b>Tejido adiposo total (%)<sup>2</sup></b>	<b>4.8±0.7</b>	<b>25.1±3.2<sup>a</sup></b>	<b>8.9±2.9<sup>b</sup></b>	<b>7.8±2.4<sup>b</sup></b>	+	+	+	<b>13.4±2.9</b>	<b>10.5±4.4</b>	+	<b>11.4±1.4<sup>b</sup></b>	<b>9.4±4.5<sup>b</sup></b>	<b>9.9±2.4<sup>b</sup></b>	<b>11.9±3.8<sup>b</sup></b>	<b>11.0±3.3<sup>b</sup></b>	<b>10.2±3.5<sup>b</sup></b>

<sup>1</sup>(peso de tejido / peso corporal al día 35 de iniciado el tratamiento (planta, vehículo ó sibutramina).

<sup>2</sup>dado que el tejido adiposo tiene cerca del 80 % de lípidos (0,8g lípido/g tejido) se aplica este valor al lípido total para tener una estimación del contenido de tejido adiposo del animal completo (Ferrer-Lorente *et al.*, 2005).

<sup>a</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta balanceada.

<sup>b</sup>*P* < 0.05 versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

+ = Muerte antes de finalizar el experimento. Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres observaciones.

### 7.1.6 Análisis de la composición química de tejido adiposo y no adiposo por CG-EM.

Se analizó la composición química de las grasas obtenidas por el método de Folch, empleando CG-EM (Cuadro 17). Los animales alimentados con una dieta de cafetería incrementaron la cantidad de ácidos grasos saturados de cadena larga (más de 8 átomos de carbono); tales como el ácido tridecanoico (C13:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0). Por otro lado los ácidos grasos monoinsaturados como lo son el ácido 7-hexadecanoico (C16:1 $\omega$ -9), palmitoleico (C16:1 $\omega$ -7) y oleico (C18:1 $\omega$ -9) incrementaron significativamente en los animales tratados con una dieta de cafetería.

En análisis de las grasas de los animales obesos mostró la presencia de ácidos poliinsaturados como el ácido araquidónico (C20:4 $\omega$ -6) y linoleico (C18:2 $\omega$ -6). Los animales obesos desarrollaron un proceso de inflamación, debido a la acumulación del ácido araquidónico en el corazón, hígado y músculo. Adicionalmente el tratamiento con una dieta de cafetería, provocó un posible proceso de esteatohepatitis (inflamación grasa del hígado), debido a que los niveles de colesterol incrementaron a un 15% (Cuadro 17).

El tratamiento con el extracto acuoso de *H. silenoides* revirtió la acumulación de ácidos grasos saturados en los tejidos no adiposos. El ácido palmítico disminuyó un 24% en el corazón mientras que el mirístico estuvo ausente en los tejidos evaluados. Adicionalmente el extracto generó un incremento en los ácidos grasos esenciales. Los niveles bajos de ácido palmitoleico, son indicadores de la presencia de ácidos grasos esenciales en los sujetos de investigación.

Los ácidos grasos monoinsaturados como lo son el oleico y 7-hexadecanoico disminuyeron con el tratamiento de *H. silenoides*. En contraste el ácido araquidónico, disminuyó en un 30% en el corazón y desapareció en el hígado. En otras palabras el extracto acuoso de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg revirtió el proceso de lipotoxicidad provocado por la ingesta de una dieta de cafetería.

Cabe destacar la ausencia de colesterol en el hígado y la presencia de ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico ó 12-OH 18:1 9c) en el tejido adiposo blanco de los animales tratados con *H. silenoides*.

**Cuadro 17.** Compuestos identificados por CG-EM en tejido adiposo y no adiposo de animales tratados con *H. silenoides*.

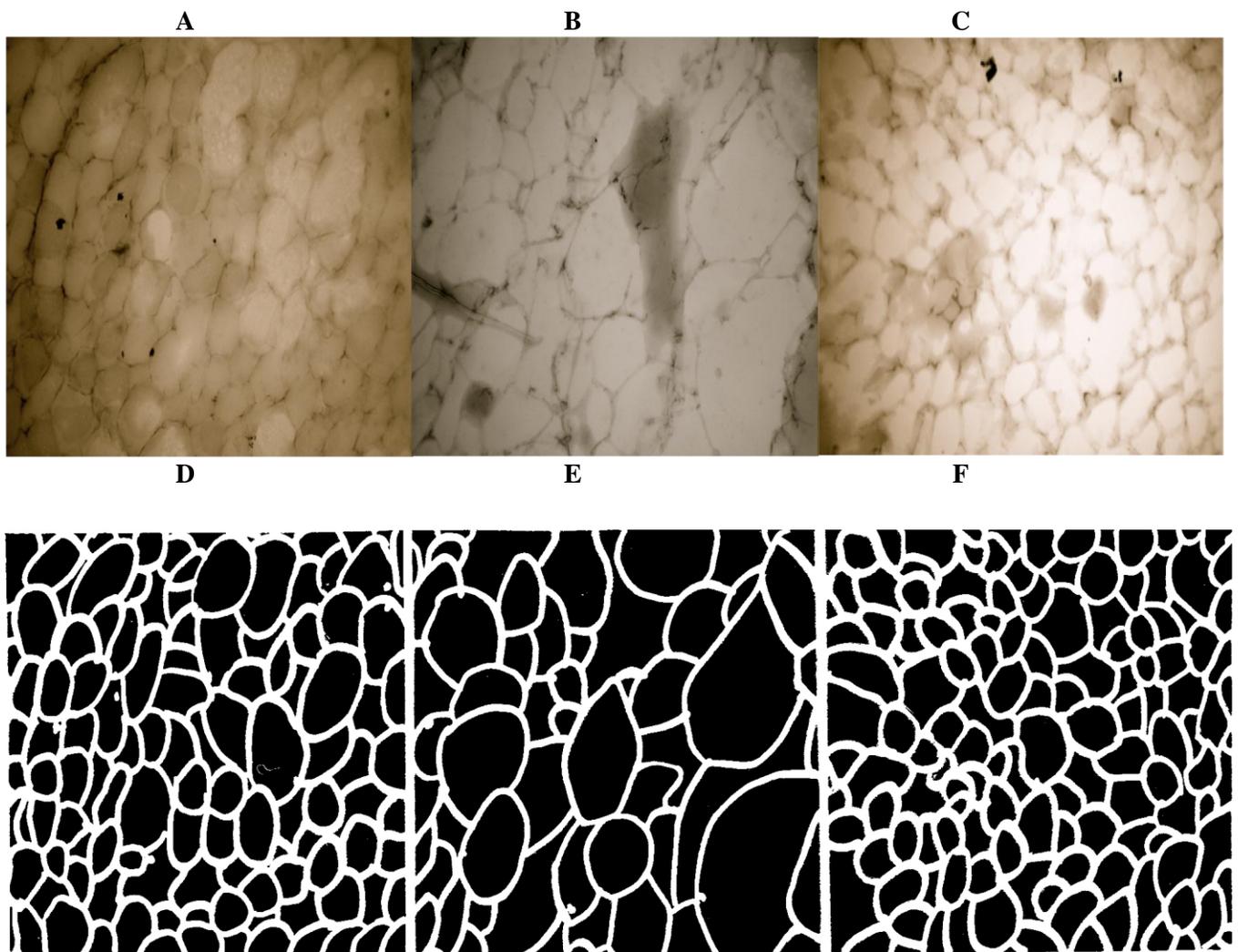
Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos tres observaciones.

SFAs=Ácidos Grasos Saturados; MUFAs= Ácidos Grasos Monoinsaturados; PUFAs=Ácidos Grasos Poliinsaturados

Ácido Graso	Dieta Balanceada					Dieta de cafetería					<i>H. silenoides</i>						
	TAB Área % <sup>d</sup>	Corazón Área % <sup>d</sup>	Hígado Área % <sup>d</sup>	Riñón Área % <sup>d</sup>	Músculo Área % <sup>d</sup>	TAB Área % <sup>d</sup>	TAP Área % <sup>d</sup>	Corazón Área % <sup>d</sup>	Hígado Área % <sup>d</sup>	Riñón Área % <sup>d</sup>	Músculo Área % <sup>d</sup>	TAB Área % <sup>d</sup>	TAP Área % <sup>d</sup>	Corazón Área % <sup>d</sup>	Hígado Área % <sup>d</sup>	Riñón Área % <sup>d</sup>	Músculo Área % <sup>d</sup>
C7:0	-	-	-	-	-	-	-	6.10 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9:0	-	-	-	0.30 $\pm$ 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	0.50 $\pm$ 0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C13:0	0.70 $\pm$ 0.01	0.6 $\pm$ 0.02	40.0 $\pm$ 4.20	11.00 $\pm$ 1.35	12.80 $\pm$ 0.93	1.30 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.97 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	2.30 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.70 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	-	3.46 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	2.16 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	10.40 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
C14:0	-	-	-	-	0.10 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	-	-
C16:0	6.90 $\pm$ 0.14	13.70 $\pm$ 0.40	-	-	-	35.5 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>	24.20 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	40.73 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	12.48 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	33.10 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	19.41 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	25.75 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup>	23.97 $\pm$ 0.89	32.98 $\pm$ 4.33 <sup>b</sup>	30.96 $\pm$ 2.25 <sup>b</sup>	26.52 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>	31.38 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>
C17:0	22.90 $\pm$ 0.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10 $\pm$ 0.01	-
C18:0	-	2.00 $\pm$ 0.10	-	-	-	2.52 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	-	8.91 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	7.69 $\pm$ 0.30	3.46 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	11.53 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	-	-	13.71 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	5.14 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	-
C27:0	-	-	-	0.20 $\pm$ 0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total SFAs</b>	<b>30.50<math>\pm</math>0.60</b>	<b>16.30<math>\pm</math>0.52</b>	<b>40.0<math>\pm</math>4.20</b>	<b>11.50<math>\pm</math>1.41</b>	<b>13.40<math>\pm</math>0.98</b>	<b>40.26<math>\pm</math>1.58<sup>a</sup></b>	<b>25.40<math>\pm</math>1.27<sup>a</sup></b>	<b>57.51<math>\pm</math>1.92<sup>a</sup></b>	<b>21.09<math>\pm</math>0.83<sup>a</sup></b>	<b>38.86<math>\pm</math>1.53<sup>a</sup></b>	<b>32.64<math>\pm</math>1.28<sup>a</sup></b>	<b>26.82<math>\pm</math>1.29<sup>b</sup></b>	<b>27.43<math>\pm</math>1.02</b>	<b>35.14<math>\pm</math>4.62<sup>b</sup></b>	<b>45.28<math>\pm</math>3.29<sup>b</sup></b>	<b>31.92<math>\pm</math>1.02<sup>b</sup></b>	<b>41.78<math>\pm</math>1.37<sup>b</sup></b>
C9:1 $\omega$ -6	-	-	-	-	37.21 $\pm$ 2.71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:1 $\omega$ -7	-	-	-	-	-	3.62 $\pm$ 0.14	19.51 $\pm$ 0.98	-	-	6.82 $\pm$ 0.27	2.79 $\pm$ 0.11	5.48 $\pm$ 0.26	-	-	-	-	-
C16:1 $\omega$ -9	0.84 $\pm$ 0.02	0.80 $\pm$ 0.02	-	0.50 $\pm$ 0.06	2.80 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.03	4.70 $\pm$ 0.24	6.07 $\pm$ 0.24	6.56 $\pm$ 0.26	-	-	1.50 $\pm$ 0.07	6.98 $\pm$ 0.26	6.39 $\pm$ 0.84	3.94 $\pm$ 0.28	7.60 $\pm$ 0.24	8.37 $\pm$ 0.28
C18:1 $\omega$ -7	-	-	-	-	1.00 $\pm$ 0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 $\omega$ -8	-	8.57 $\pm$ 0.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23.38 $\pm$ 1.12	56.31 $\pm$ 2.09	-	-	-	49.83 $\pm$ 1.64
C18:1 $\omega$ -9	22.87 $\pm$ 0.45	24.45 $\pm$ 0.68	31.7 $\pm$ 3.31	37.24 $\pm$ 4.58	36.85 $\pm$ 2.69	44.40 $\pm$ 1.74	50.27 $\pm$ 2.52	-	26.99 $\pm$ 1.06	30.38 $\pm$ 1.19	56.10 $\pm$ 2.20	26.06 $\pm$ 1.25	-	58.45 $\pm$ 7.67	49.84 $\pm$ 3.61	60.40 $\pm$ 1.92	-
C18:1 $\omega$ -10	-	23.53 $\pm$ 0.65	-	-	-	-	-	17.42 $\pm$ 0.68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total MUFAs</b>	<b>23.71<math>\pm</math>0.47</b>	<b>57.35<math>\pm</math>1.59</b>	<b>31.7<math>\pm</math>3.31</b>	<b>37.74<math>\pm</math>4.64</b>	<b>77.86<math>\pm</math>5.67</b>	<b>48.67<math>\pm</math>1.91</b>	<b>74.92<math>\pm</math>3.74</b>	<b>23.49<math>\pm</math>0.92</b>	<b>33.55<math>\pm</math>1.32</b>	<b>37.2<math>\pm</math>1.46</b>	<b>58.89<math>\pm</math>2.31</b>	<b>56.42<math>\pm</math>2.7</b>	<b>63.29<math>\pm</math>2.35</b>	<b>64.84<math>\pm</math>8.51</b>	<b>53.78<math>\pm</math>3.89</b>	<b>68.00<math>\pm</math>2.16</b>	<b>58.20<math>\pm</math>1.92</b>
C6:2 $\omega$ -2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.70 $\pm$ 0.03	-	-	-	-	-	-
C12:2 $\omega$ -6	-	-	-	0.45 $\pm$ 0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:2 $\omega$ -2	-	-	-	-	-	11.04 $\pm$ 0.43	-	-	-	-	7.15 $\pm$ 0.28	-	-	-	-	-	-
C18:2 $\omega$ -3	-	-	-	37.24 $\pm$ 4.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:2 $\omega$ -6	22.88 $\pm$ 0.45	26.40 $\pm$ 0.73	17.40 $\pm$ 1.82	12.72 $\pm$ 1.56	8.69 $\pm$ 0.63	-	-	-	28.65 $\pm$ 1.13	23.96 $\pm$ 0.94	-	6.68 $\pm$ 0.80	9.25 $\pm$ 0.34	-	-	-	-
C18:2 $\omega$ -7	22.87 $\pm$ 0.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 $\omega$ -4	-	-	-	0.36 $\pm$ 0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 $\omega$ -6	-	-	-	-	-	-	-	13.10 $\pm$ 0.51	1.30 $\pm$ 0.05	-	-	-	-	-	0.90 $\pm$ 0.07	-	-
<b>Total PUFAs</b>	<b>45.75<math>\pm</math>0.90</b>	<b>26.40<math>\pm</math>0.73</b>	<b>17.40<math>\pm</math>1.82</b>	<b>50.77<math>\pm</math>5.25</b>	<b>8.69<math>\pm</math>0.63</b>	<b>11.04<math>\pm</math>0.43</b>	<b>0.0</b>	<b>13.10<math>\pm</math>0.51</b>	<b>29.95<math>\pm</math>1.18</b>	<b>23.96<math>\pm</math>0.94</b>	<b>7.85<math>\pm</math>0.31</b>	<b>6.68<math>\pm</math>0.80</b>	<b>9.25<math>\pm</math>0.34</b>	<b>0.0</b>	<b>0.90<math>\pm</math>0.07</b>	-	-
Otros																	
12-OH18:1 9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.0 $\pm$ 0.80	-	-	-	-	-
Retinal	-	10.4 $\pm$ 0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Derivado del colesterol	-	-	-	-	-	-	5.9 $\pm$ 0.10	-	-	0.6 $\pm$ 0.2	-	-	-	-	-	-	-
Colesterol	-	-	-	-	-	-	-	15.4 $\pm$ 1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

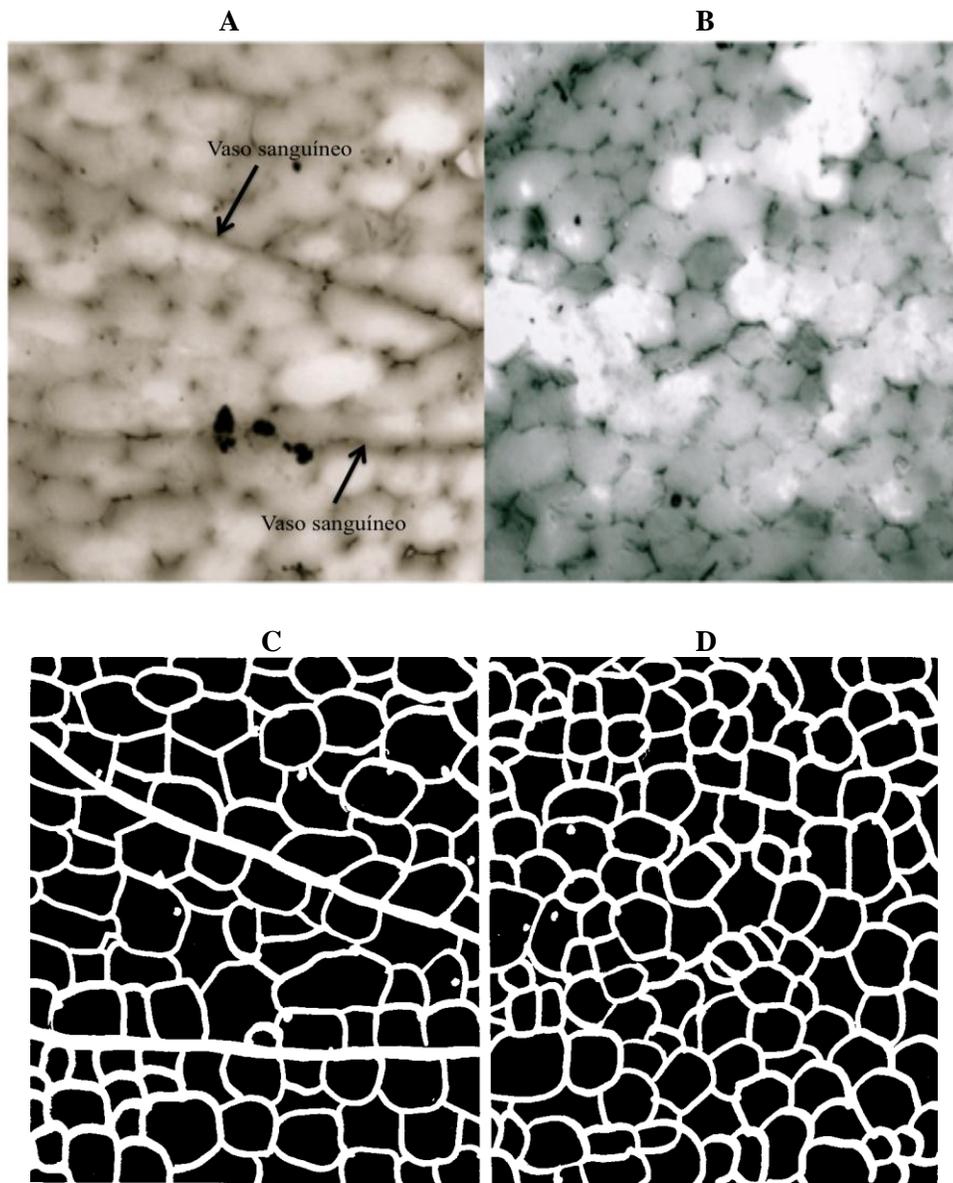
### 7.1.7 Efecto de *H. silenoides* sobre adipocitos blancos y pardos.

En las figuras 8 y 9 se presentan las imágenes obtenidas de los adipocitos pardos y blancos. Los adipocitos blancos se caracterizaron por una forma redondeada y/o poliédrica con citoplasma y núcleo comprimido contra la membrana celular por acción de la gran gota de grasa que almacena en su interior (Figura 8). Mientras que los adipocitos pardos se caracterizaron por estar altamente vascularizados, en la figura 9B se aprecia un vasos sanguíneos (flechas) y presentaron una forma de hexágono.



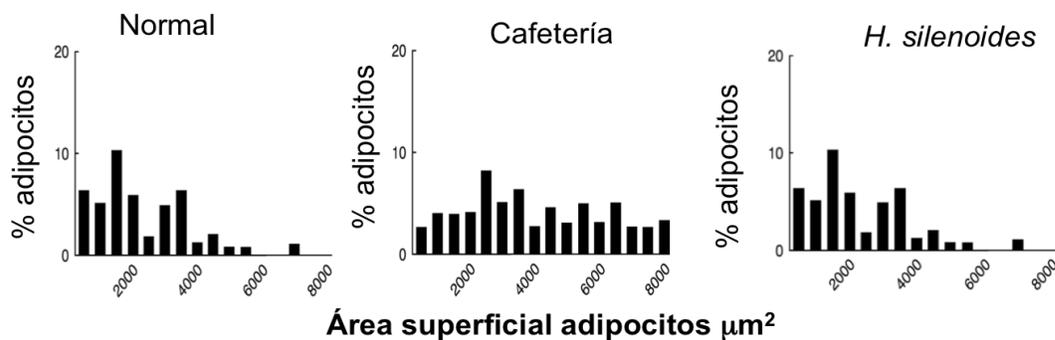
**Figura 8.** Aspecto histológico del tejido adiposo blanco teñido con hematoxilina de Harris y rojo aceitoso O. x 10 aumentos. A) Dieta balanceada, B) Dieta de cafetería y C) Dieta de cafetería + *H. silenoides*. Conversión a sistema binario D) Dieta balanceada, E) Dieta de cafetería y F) Dieta de cafetería + *H. silenoides*

Cada imagen fue generada en menos de 5 minutos.

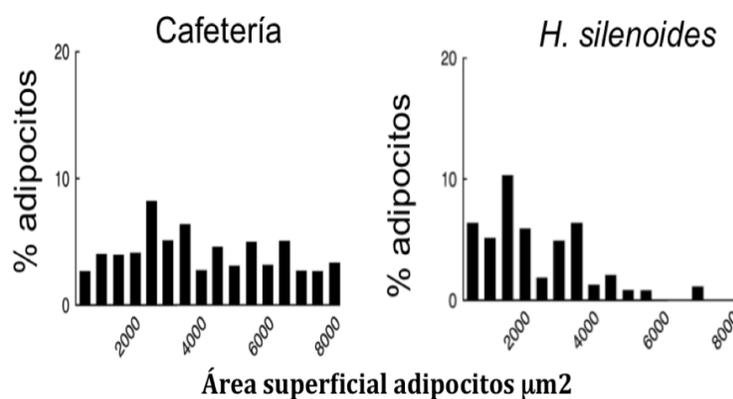


**Figura 9.** Aspecto histológico del tejido adiposo pardo teñido con hematoxilina de Harris y rojo aceitoso O. x 10 aumentos. A) Dieta de cafetería y B) Dieta de cafetería + *H. silenoides*. Conversión a sistema binario C) Dieta de cafetería y D) Dieta de cafetería + *H. silenoides*  
Cada imagen fue generada en menos de 5 minutos.

La ingesta de una dieta hipercalórica incrementó el depósito graso, a expensas de una hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo blanco y pardo, en otras palabras incrementó el tamaño y número de estas células. El análisis espacial de las fotografías de los adipocitos, mostró que el tratamiento con una dieta de cafetería incrementó el tamaño (2000 a 8000  $\mu\text{m}^2$ ) de los adipocitos pardos y blancos (Gráfica 6 y 7). Adicionalmente el tratamiento con el extracto acuoso de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg, provocó una disminución de la adipogénesis, es decir disminuyó el tamaño (1000 y 6000  $\mu\text{m}^2$ ) y número de adipocitos respecto a los animales obesos (Gráfica 6 y 7).



**Gráfica 6.** Histograma de la distribución del tamaño de los adipocitos blancos en ratas macho Wistar. Se emplearon al menos 30 fotografías.



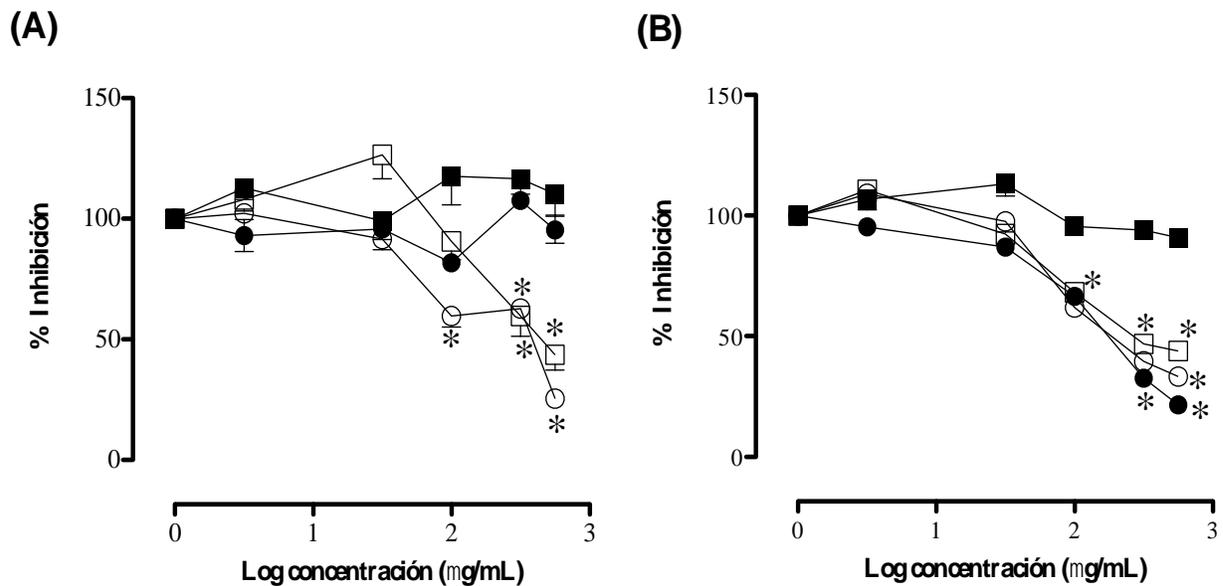
**Gráfica 7.** Histograma de la distribución del tamaño de los adipocitos pardos en ratas macho Wistar. Se emplearon al menos 30 fotografías.

## 7.2 Ensayo *in vitro*.

### 7.2.1 Efecto de *Hypericum* sobre la inhibición de la lipasa pancreática porcina.

Los extractos de diclorometano y acuoso de *H. silenoides* (Gráfica 8) presentaron actividad inhibitoria de la lipasa pancreática de forma significativa ( $p < 0.05$ ). En contraste, los demás extractos no presentaron actividad *in vitro*.

Tres de los cuatro extractos (hexano, diclorometano y acuoso) obtenidos a partir de *H. philonotis* (Gráfica 8) inhibieron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a la lipasa pancreática porcina por más del 50%, respecto al punto inicial de la gráfica el cual no contiene inhibidor (extracto).



**Gráfica 8.** Curva de la actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática porcina de los extractos de *H. silenoides* (A) e *H. philonotis* (B). Hexano (●), diclorometano (○), metanol (■) y acuoso (□). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos nueve observaciones. \* $p < 0.05$  y  $\alpha 0.05$  respecto al punto inicial de la gráfica.

El extracto hexánico de *H. philonotis* fue el extracto que presentó mayor actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática porcina ( $CI_{50}= 162.60\pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ), seguido del extracto de diclorometano ( $CI_{50}= 197.24\pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ ) y del extracto acuoso ( $CI_{50}= 341.45\pm 0.07 \mu\text{g/mL}$ ) (Cuadro 18). Por otro lado, solamente los extractos diclorometánico y acuoso de *H. silenoides* mostraron actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática porcina ( $CI_{50}= 262.79\pm 0.09 \mu\text{g/mL}$  y  $CI_{50}= 403.70\pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. El fármaco orlistat, usado como referencia presentó una  $CI_{50}= 0.041\pm 0.0028 \mu\text{g/mL}$  (Cuadro 18).

**Cuadro 18.** Concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) de los extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis* en el modelo *in vitro* de lipasas pancreática porcina.

Tratamiento	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b><i>H. silenoides</i></b>	
Extracto hexánico	NA
Extracto diclorometánico	$262.79 \pm 0.09^a$
Extracto metanólico	NA
Extracto acuoso	$403.70 \pm 0.08^a$
<b><i>H. philonotis</i></b>	
Extracto hexánico	$162.60 \pm 0.02^a$
Extracto diclorometánico	$197.24 \pm 0.11^a$
Extracto metanólico	NA
Extracto acuoso	$341.45 \pm 0.07^a$
Orlistat	$0.04 \pm 0.03^a$

Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos nueve observaciones.

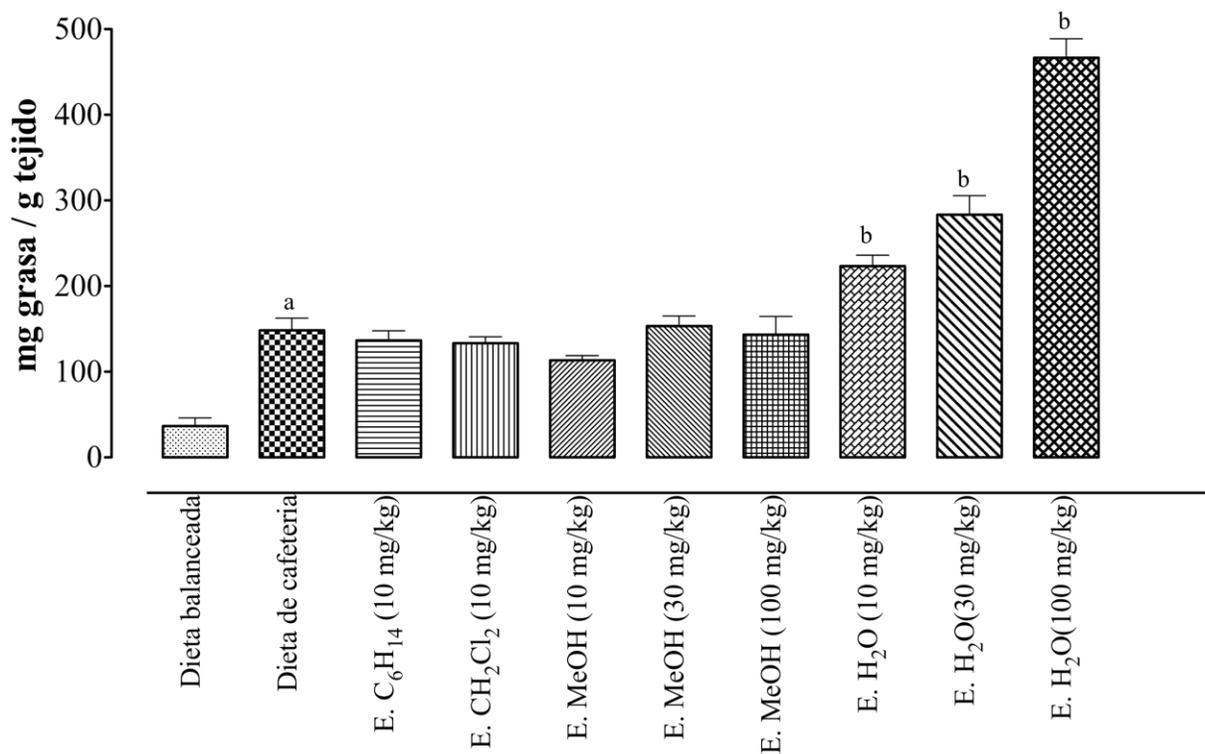
NA = No activo. <sup>a</sup> $P < 0.05$  versus control.

La actividad inhibitoria de lipasas pancreáticas de las plantas estudiadas, se complementó con el análisis de grasas provenientes de heces (Gráfica 9). El tratamiento con la dieta de cafetería incrementó significativamente la cantidad de grasas excretadas por heces vs dieta balanceada ( $p < 0.05$ ). Mientras que durante el tratamiento con el extracto acuoso de *H. silenoides*, la cantidad de grasas excretadas en heces se incrementó significativamente.

Cabe destacar que las grasas extraídas de los animales tratados con el extracto acuoso presentaron una coloración naranja mientras que las de los animales obesos era de un color amarillo tenue. En contraste los extractos orgánicos de *H. silenoides* no incrementaron la cantidad de grasas

excretadas. Estos datos sugieren que el extracto acuoso de *H. silenoides* inhibe la actividad de la lipasa pancreática *in vivo*.

A pesar de que el extracto hexánico de *H. philonotis* fue el más activo al inhibir las lipasas *in vitro*, esta información no se pudo complementar *in vivo*, debido a que los animales murieron a los 15 días de iniciada su administración. Sin embargo estos animales desarrollaron diarrea grasa, lo que sugiere que este extracto *in vivo* inhibe la actividad de esta enzima. Los extractos diclorometánico, metanólico y acuoso no incrementaron la cantidad de grasas excretadas por heces (Cuadro 16).



**Gráfica 9.** Cantidad de grasas presentes en heces de animales tratados con los extractos de *H. silenoides*.

Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos tres observaciones.

<sup>a</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta balanceada.

<sup>b</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

La dieta de cafetería incrementó significativamente la cantidad del ácido tridecanoico excretado en heces ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente los ácidos saturados como lo son el palmítico y esteárico, disminuyeron significativamente en los animales obesos (Cuadro 19).

En contraste el tratamiento con el extracto acuoso de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg, incrementó la cantidad de ácidos grasos saturados excretados como lo son el ácido 7-hexadecenoico, ácido mirístico y ácido 12-metil tetradecanoico. Cabe destacar que la cantidad de ácido palmítico incrementó en las heces, lo que es un indicio de que este ácido graso saturado no está siendo acumulado en el organismo.

**Cuadro 19.** Compuestos identificado por CG-EM presentes en el excremento de ratas tratadas con el extracto acuoso de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg.

Compuesto	Dieta Normal (%)	Dieta de Cafetería (%)	<i>H. silenoides</i> (%)
Ácido esteárico	26.25±0.45	-	-
Colestanol	9.26±0.02	-	-
Estigmasterol	28.17±1.12	-	-
Ácido oxálico	-	2.78±0.06 <sup>a</sup>	-
Ácido tridecanoico	2.44±0.02	94.60±0.63 <sup>a</sup>	38.29±2.20 <sup>b</sup>
Ácido palmítico	33.88±1.57	-	14.20±1.25 <sup>b</sup>
Ácido 7-hexadecenoico	-	-	33.86±1.12 <sup>b</sup>
Metil isolitocolato	-	-	5.58±0.26 <sup>b</sup>
Ácido mirístico	-	-	5.35±0.34 <sup>b</sup>
Ácido 12-metil tetradecanoico	-	-	2.73±0.68 <sup>b</sup>

Cada punto representa la media ± EEM de al menos tres observaciones.

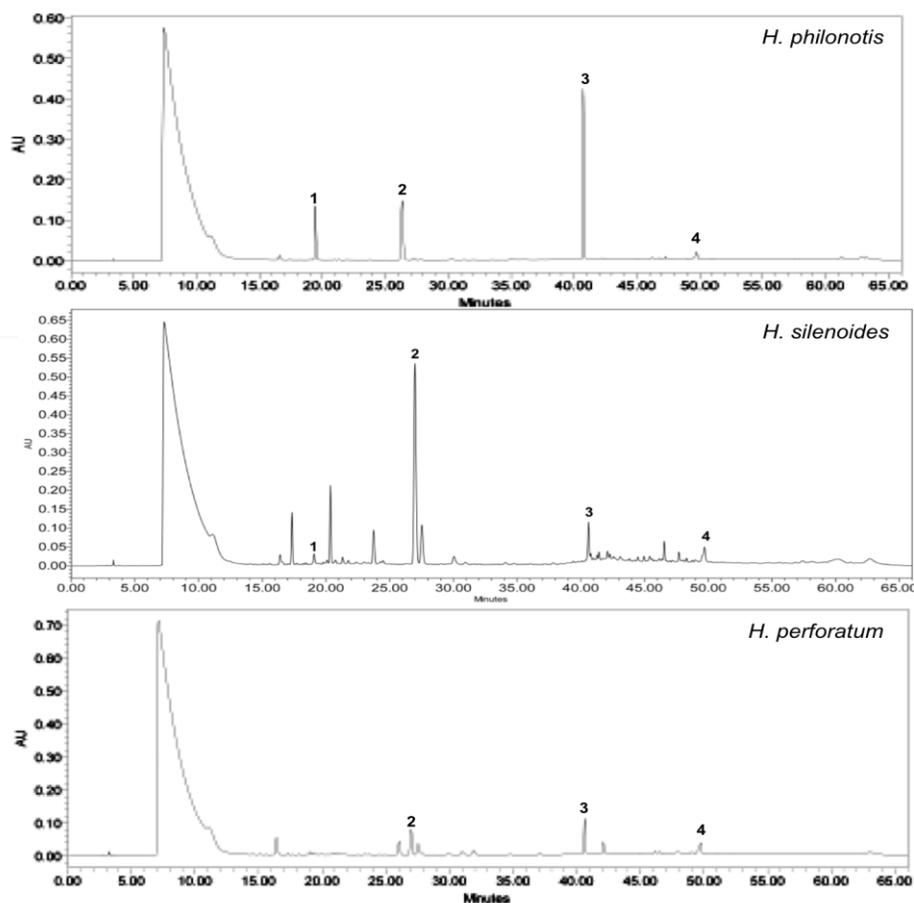
<sup>a</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta balanceada.

<sup>b</sup> $P < 0.05$  versus grupo alimentado con dieta de cafetería.

- = Ausente

### 7.3 Composición química de *H. silenoides* e *H. philonotis* por HPLC.

Los compuestos identificados en los extractos acuosos de *H. silenoides* e *H. philonotis* por medio de la técnica HPLC fueron rutina, quercetina, ácido clorogénico e hiperforina (Figura 9). Los tiempos de retención de los compuestos de referencia se muestran en el cuadro 20.



**Figura 10.** Perfil cromatográfico de *H. philonotis*, *H. silenoides* e *H. perforatum* por HPLC.

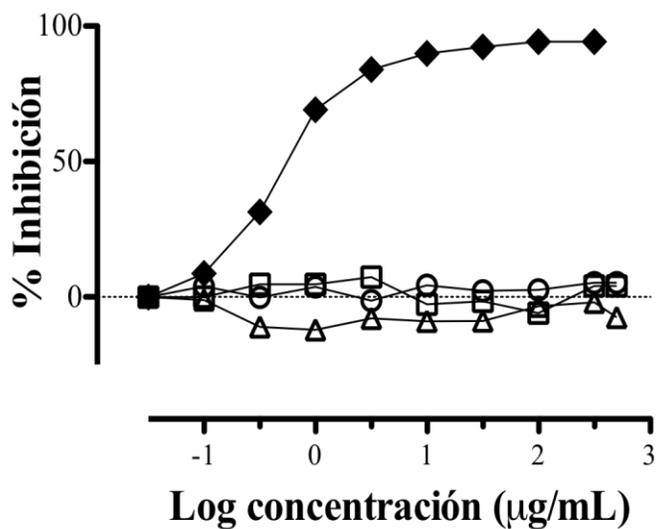
Pico 1 ácido clorogénico; pico 2 rutina; pico 3 quercetina; pico 4 hiperforina.

**Cuadro 20.** Tiempos de retención ( $T_R$ ) de compuestos de referencia.

Referencias	<i>H. perforatum</i> ( $T_R$ min)	<i>H. philonotis</i> ( $T_R$ min)	<i>H. silenoides</i> ( $T_R$ min)
1. Ácido clorogénico	19.406	19.420	19.442
2. Rutina	26.306	26.307	26.312
3. Quercetina	40.707	40.712	40.701
4. Hipericina	49.713	49.710	49.710
5. Pseudohipericina	49.723	49.723	49.724
6. Hiperforina	49.740	49.741	49.746

#### 7.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de lipasas *in vitro* de la quercetina, ácido clorogénico y rutina.

Los compuestos identificados en el extracto acuoso de *H. silenoides* e *H. philonotis* no inhibieron la actividad de la lipasa pancreática porcina (Gráfica 10).



**Gráfica 10.** Curva de la actividad inhibitoria sobre la lipasa pancreática porcina de los compuestos identificados en *H. silenoides* e *H. philonotis*.

Fármaco de referencia Orlistat (◆), quercetina (□), ácido clorogénico (○) y rutina (△).

Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de al menos nueve observaciones.

\* $p < 0.05$  respecto al punto inicial de la gráfica.

## 7.5 Rendimiento de extractos y aceites esenciales.

En el cuadro 21 se presentan los rendimientos de los extractos y aceites esenciales obtenidos a partir de las plantas estudiadas.

**Cuadro 21.** Rendimientos de los extractos y de los aceites esenciales de *H. silenoides* e *H. philonotis*.

Muestra vegetal	Planta macerada (kg)	Extracto	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
<i>H. silenoides</i>	3	Hexano	70.7	2.3
		Diclorometano	58.3	1.9
		Metanol	283.0	1.4
	0.5	Acuoso	17.4	8.7
	0.6	Aceite esencial	0.6	0.1
<i>H. philonotis</i>	5	Hexano	128.4	2.5
		Diclorometano	74.8	1.5
		Metanol	678.1	13.3
	0.5	Acuoso	11.3	5.6
	0.5	Aceite esencial	1.0	0.2

## 7.6 Composición química de los aceites esenciales de *H. silenoides* e *H. philonotis*.

Los compuestos identificados en los aceites esenciales de las partes aéreas de *H. silenoides* e *H. philonotis* por la técnica CG-EM se detallan en el cuadro 22. Un total de 49 diferentes compuestos fueron identificados en *H. silenoides* e *H. philonotis*, de los cuales 17 estuvieron presentes en ambos aceites esenciales. En resumen, 38 componentes fueron identificados en *H. silenoides* y 18 compuestos en *H. philonotis*, que corresponden al 90.1% y al 99.2% de la composición total, respectivamente (Cuadro 22).

Los compuestos más abundantes de *H. silenoides* fueron *n*-nonano (11.8%), 1-tridecanol (11.6%) y *n*-dodecanal (10.5%). Mientras que los componentes mayoritarios detectados en *H. philonotis* fueron 2-metil octano (52.7%), *n*-nonano (35.9%) y  $\beta$ -pineno (3.5%).

En el aceite esencial de *H. philonotis*, el grupo de alcanos fueron los compuestos mayoritarios (33.3%), mientras que *H. silenoides* contiene solo un 18.4%. En contraste, *H. silenoides* presentó un alto contenido de monoterpenos hidrocarbonados (15.8%).

**Cuadro 22.** Composición química de los aceites esenciales de *H. silenoides* e *H. philonotis*.

No.	Nombre <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Literatura IR <sup>c</sup>		<i>H. silenoides</i>	<i>H. philonotis</i>	ID <sup>e</sup>
			ADAMS	NIST 08			
1	<i>n</i> -Octano	799	800	800	t	0.1±0.0	IR, EM
2	2-Hexenal	856	854	855	0.1±0.0	-	IR, EM
3	3-Hexen-1-ol	861	857	858	3.0±0.0	-	IR, EM
4	2-Metiloctano	863	865	864	7.4±0.0	52.7±0.1	IR, EM
5	<i>n</i> -Nonano	900	900	900	11.8±0.2	35.9±0.0	IR, EM
6	2,3,5-Trimetil-1,3-hexadieno	923	-	-	1.3±0.0	0.5±0.0	EM
7	$\alpha$ -Triciclono	929	926	927	0.1±0.0	-	IR, EM
9	$\alpha$ -Pino	937	939	937	9.4±0.2	-	IR, EM
10	Camfeno	959	953	956	1.3±0.0	t	IR, EM
11	3-Metil-nonano	978	971	972	1.3±0.0	2.3±0.0	IR, EM
12	$\beta$ -Pino	980	979	980	8.1±0.1	3.5±0.0	IR, EM
13	6-Metil-5-hepten-2-ona	983	985	986	0.3±0.0	-	IR, EM
14	Mirceno	992	990	991	-	t	IR, EM
15	<i>n</i> -Decano	1003	999	1000	0.2±0.0	0.6±0.0	IR, EM
17	<i>p</i> -Cimeno	1022	1026	1027	0.4±0.0	-	IR, EM
18	Limoneno	1031	1030	1031	0.6±0.0	-	IR, EM
19	<i>p</i> -Cineol	1039	1032	1035	0.5±0.0	-	IR, EM
20	8-Metil-1-deceno	1061	1061	1062	0.5±0.0	-	IR, EM
21	2-Metildecano	1065	1068	1061	0.5±0.0	0.3±0.0	IR, EM
23	Linalool	1091	1098	1092	1.5±0.0	-	IR, EM
24	<i>n</i> -Undecano	1100	1099	1100	1.8±0.0	-	IR, EM
26	Verbenol	1139	1140	1140	0.2±0.0	-	IR, EM
27	Camfor	1144	1143	1145	1.0±0.0	-	IR, EM
28	2-Nonenol	1148	-	1149	1.8±0.0	-	IR, EM
29	$\alpha$ -Terpineol	1187	1189	1187	0.6±0.0	-	IR, EM
30	Estragol	1200	1195	1196	1.0±0.0	-	IR, EM
31	<i>n</i> -Decanal	1206	1201	1207	2.8±0.0	0.2±0.0	IR, EM
32	4-Octanol, propanoato	1227	1230	1230	-	-	IR, EM
33	Pulegona	1234	1237	1237	4.7±0.1	-	IR, EM
34	1-Decanol	1276	1269	1275	-	t	IR, EM
35	$\alpha$ -Limoneno	1297	1294	1294	-	0.1±0.0	IR, EM
36	<i>n</i> -Undecanal	1312	1313	1310	0.2±0.0	-	IR, EM
37	1-Undecanol	1373	1371	1371	-	-	IR, EM
38	Patchouleno	1379	1380	1378	-	0.8±0.0	IR, EM
39	2-Tetradecenol	1383	-	-	0.5±0.0	-	EM
40	<i>n</i> -Dodecanal	1401	1407	1409	10.5±0.0	-	IR, EM
41	Cariofileno	1418	1418	1419	0.6±0.0	0.7±0.0	IR, EM
42	$\alpha$ -Santaleno	1427	1420	1428	0.8±0.0	-	IR, EM
43	Bergamoteno	1431	1436	1434	0.9±0.0	-	IR, EM
44	$\beta$ -Farneseno	1459	1458	1450	0.3±0.0	0.3±0.0	IR, EM
45	Nerolidol	1563	1564	1563	2.0±0.0	1.2±0.0	IR, EM
46	Óxido de Cariofileno	1586	1581	1582	0.3±0.0	t	IR, EM
47	1-Tridecanol	1596	1593	1593	11.6±0.1	-	IR, EM
48	1,2-epóxido $\alpha$ -humuleno	1604	1606	1607	0.2±0.0	-	IR, EM
49	Santalol	1676	1678	1678	-	-	IR, EM
	<b>Total</b>				<b>90.1</b>	<b>99.2</b>	
	Tipo de compuestos						
I	Alcanos				18.4	33.3	
II	Alcanoles				10.5	5.5	
III	Monoterpenos hidrocarbonados				15.8	16.7	
IV	Monoterpenos oxigenados				18.4	5.6	
V	Sesquiterpenos hidrocarbonados				10.5	16.7	
VI	Sesquiterpenos oxigenados				7.9	11.1	
VII	Otros				18.4	11.1	

<sup>a</sup> Compuestos en orden de elución en una columna DB5.

<sup>b</sup> Índice de retención en una columna DB5, determinados experimentalmente usando alcanos C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>.

<sup>c</sup> Índice de retención tomado de Adams y/o NIST08 para una columna capilar DB5.

<sup>d</sup> Valores de representan la media de 3 determinaciones  $\pm$  SD.

<sup>e</sup> Métodos de identificación: EM, por comparación del espectro de masas experimental con el reportado en la literatura (Adams, 1989 y NIST 08); IR por comparación del índice de retención con el reportado en la literatura (Adams, 1989 y NIST 08).

t = trazas (< 0.1%); - = ausente.

## VIII. DISCUSIÓN.

La dieta de cafetería compuesta por alimentos mexicanos, provocó un estado de obesidad tipo 1 en ratas macho Wistar (Gráfica 1), aumentando el depósito de grasa, a costa de una hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo. La ganancia de peso en los animales tratados con esta dieta durante 77 días, ha sido previamente reportada en otros estudios (Rothwell y Stock, 1980; Naim *et al.*, 1985; Prats *et al.*, 1989; Lladó *et al.*, 1995, 1999). Se identificaron dos fases en el incremento del peso corporal (Gráfica 1). Estas fases son debidas probablemente a las adaptaciones fisiológicas y metabólicas que se producen en el desarrollo de la obesidad [hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo pardo, durante las primeras semanas de iniciada la administración de la dieta de cafetería (Falcou *et al.*, 1985)]. Durante los primeros 15 días, no se observó un incremento estadísticamente significativo en el peso corporal de los animales alimentados con esta dieta. La segunda fase, da comienzo cuando se alcanza la máxima capacidad de activación del tejido adiposo pardo, y por lo tanto el incremento del peso corporal es proporcional al incremento del consumo energético (Rothwell y Stock, 1979).

La dieta de cafetería empleada en este trabajo posee un elevado contenido de kcalorías, carbohidratos y lípidos (Gráfica 2). Adicionalmente es una dieta variada en sabores, olores y texturas, que incitan al animal de experimentación a su consumo (alta palatabilidad), de manera que se consigue una ruptura en el control de la ingesta, induciendo al animal a una hiperfagia voluntaria (Sclafani y Springer, 1976; Rothwell *et al.*, 1979, 1980). La respuesta a la dieta de cafetería es muy rápida, ya que desde el primer día los animales de experimentación presentaron hiperfagia ( $30.0 \pm 2.75$  g) comparados con los animales que consumen dieta balanceada ( $3.6 \pm 0.6$  g). El aumento de la ingesta calórica desemboca en la aparición de un estado obeso (Rothwell *et al.*, 1979, 1980; Gianotti *et al.*, 1990; Llado *et al.*, 1995, 1999). Por otra parte en este modelo de obesidad tiene especial importancia la restricción de la actividad física, ya que los animales se encuentran restringidos a un espacio pequeño. Así pues, este modelo presenta una gran semejanza con la obesidad que padecen los seres humanos (Vasselli *et al.*, 1983) y de ahí su utilidad en el estudio de este padecimiento.

Los animales alimentados con una dieta de cafetería desarrollaron un exceso de peso corporal del 24.6% y un 20.1% de grasa corporal total, lo que representa el 16% de lípidos presentes en el animal (Cuadro 15 y 16). El modelo obtenido simula una persona que ha desarrollado una obesidad tipo 1 ( $IMC > 30$  kg/m<sup>2</sup>) (Ferrer-Lorente *et al.*, 2005). Es importante destacar que no solo el peso corporal de los animales se incrementó, sino que algunos parámetros séricos como los son el colesterol y triglicéridos también se incrementaron significativamente; lo que sugiere el desarrollo de hiperlipidemia en los animales obesos. No se debe olvidar que la hiperlipidemia es una comorbilidad asociada a la obesidad.

Después de la estandarización del modelo de obesidad, los extractos de tlanchalagua y vinagrillo fueron evaluados como agentes antiobesidad. Algunos extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis* presentaron efecto sobre la disminución del peso corporal y acciones hipoglucemiante e hipolipidémica en ratas obesas (Cuadro 13 y 14). Estudios recientes han demostrado que el extracto hidroalcohólico de *H. perforatum* disminuye significativamente la ganancia de peso corporal, los niveles plasmáticos de colesterol, LDL, triglicéridos, glucosa e insulina en ratas alimentadas con una dieta de alto contenido de lípidos y carbohidratos (Hussain *et al.*, 2011). Los autores atribuyen los resultados al incremento de los niveles de serotonina, debido a que *H. perforatum* es capaz de inhibir la recaptura sinaptosomal de este neurotransmisor (Hussain *et al.*, 2011).

Es bien conocido que existe una relación inversa entre los niveles de serotonina en el cerebro y el consumo de alimentos, cuando los niveles de serotonina aumentan el consumo de alimentos disminuye y viceversa (Lam, 2010). Adicionalmente, estudios sobre la síntesis endógena, biodisponibilidad y metabolismo de la serotonina, proveen importantes evidencias del papel que desempeña la serotonina endógena sobre la regulación del peso corporal y el consumo de alimentos (Lam, 2010). Es posible que los extractos activos de *H. silenoides* e *H. philonotis*, al igual que *H. perforatum*, puedan incrementar los niveles de serotonina, provocando la reducción del consumo de los alimentos y finalmente la pérdida de peso corporal (Lam, 2010).

Por otro lado, con la prueba de nado forzado se demostró que la administración oral de los extractos hexánico (10 mg/kg) y acuoso (100 mg/kg) de *H. silenoides* provocaron la disminución significativa del tiempo de inmovilidad, comparada con el grupo de animales obesos (Cuadro 15). Estos resultados sugieren que *H. silenoides* produce un efecto antidepressivo en ratas obesas. En contraste, los extractos de *H. philonotis* no presentaron este efecto. El fármaco de referencia sibutramina, un fármaco empleado inicialmente como antidepressivo, disminuyó el tiempo de inmovilidad a la máxima dosis evaluada (Cuadro 16).

Porsolt *et al.*, (1977) propusieron que el nado forzado es una situación estresante que después de cierto tiempo conduce al animal a un estado de desesperanza que se caracteriza por una alta frecuencia y duración de los períodos de inmovilidad. Este hecho es interpretado como una disminución de la motivación o como un bajo estado de ánimo del individuo para buscar una salida al problema (Porsolt *et al.*, 1977, 1978) en lo general se acepta que la inmovilidad incrementada reproduce uno de los síntomas principales de la depresión clínica, es decir, la falta de motivación para confrontar una situación apremiante (Pichot, 1994), lo que refleja el abatimiento del estado de ánimo. En este sentido los animales tratados con el extracto acuoso de *H. silenoides*, disminuyeron en gran medida la inmovilidad, sugiriendo

así un incremento de la motivación del animal para buscar una solución a la situación de apremio que representa el nado forzado (Porsolt *et al.*, 1978; Sánchez-Mateo *et al.*, 2005).

La hiperforina, ha sido identificada como uno de los compuestos que le confieren a *H. perforatum* su actividad antidepresiva (Briskin, 2000; Di Carlo *et al.*, 2001; Laakmann *et al.*, 1998; Müller, 2003). Este compuesto inhibe la recaptura de serotonina, dopamina y noradrenalina (Briskin, 2000; Di Carlo *et al.*, 2001; Laakmann *et al.*, 1998; Müller, 2003). Este compuesto se identificó en los extractos acuosos de las especies de *Hypericum* estudiada. Es posible que la hiperforina presente en el extracto haya incrementado los niveles de serotonina, generando un estado anoréxico en las ratas obesas y finalmente promoviendo la pérdida de peso en los animales.

Por otro lado, la actividad hipoglucémica (Husain *et al.*, 2008) y antihiperoglucémica (Husain *et al.*, 2009) han sido reportadas para el extracto estandarizado de *H. perforatum*. Se ha considerado que la hiperforina, es el compuesto que le confiere la actividad antihiperoglucémica a la hierba de San Juan. Este compuesto es un potente liberador de diversos neurotransmisores (Briskin, 2000; Di Carlo *et al.*, 2001; Laakmann *et al.*, 1998; Müller, 2003). De igual forma, se ha reportado que la hiperforina activa el canal catiónico TRPC6 (Receptor de Potencial subfamilia C6) cambiando la concentración de calcio y sodio intracelular (Leuner, 2007). Adicionalmente durante el consumo de alimentos, la acetilcolina es liberada por las terminaciones nerviosas parasimpáticas del páncreas. La acetilcolina estimula a los receptores muscarínicos tipo 3 (M<sub>3</sub>) de las células beta del páncreas, generando la secreción de insulina. Por otro lado la estimulación de los receptores M<sub>3</sub>, por parte de la acetilcolina, puede activar los canales TRP en neuronas y células beta (Ahrén, 2000; Gilon y Henquin, 2007). La activación de los canales TRP, por estimulación muscarínica, puede contribuir a la despolarización de la célula beta del páncreas y desempeñar un papel importante en los efectos potenciadores de la acetilcolina sobre la liberación de la insulina durante la alimentación (Jacobson y Philipson, 2007). Quizás los extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis* contengan compuestos similares a la hiperforina, que puedan activar al canal TRPC6 y como resultado se lleve a cabo un incremento en la cantidad de insulina liberada, provocando una actividad antihiperoglucémica.

El mecanismo de la actividad hipolipidémica de las dos especies de *Hypericum* estudiadas es desconocido. No obstante en este mecanismo pueden estar involucrado tanto el bloqueo de la biosíntesis del colesterol o la disminución de la absorción intestinal de lípidos (Ikonen, 2006). En este último supuesto, algunos extractos de *H. silenoides* e *H. philonotis* presentaron actividad inhibitoria dependiente de la concentración, en el modelo *in vitro* de la lipasa pancreática porcina (Gráfica 8). Por ejemplo los extractos de diclorometano y acuoso de *H. silenoides*, presentaron efecto inhibitorio dependiente de la

concentración. Adicionalmente, la administración *in vivo* del extracto acuoso a la dosis de 100 mg/kg mostró un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de grasas excretadas en heces (Gráfica 9), estos datos sugieren que *in vivo* la actividad de la lipasa fue inhibida por el extracto en cuestión. Como consecuencia, la absorción de los ácidos grasos libres en el intestino fue abatida, provocando una disminución de los parámetros lipídicos.

En otro sentido, el orden de potencia obtenido de los extractos de *H. philonotis* sobre la actividad inhibitoria de la lipasa fue hexano>diclorometano>acuoso. Sin embargo *in vivo* la administración del extracto acuoso y diclorometánico no incrementaron la cantidad de grasas excretadas en heces (Cuadro 16). Cabe destacar que el extracto hexánico (Gráfica 4A) de *H. philonotis* produjo toxicidad y muerte en los animales a los 15 días de iniciada su administración. Es por ello, que para este extracto no se realizó la correlación *in vivo* de la inhibición de la lipasa pancreática, a través del análisis de contenido de grasas en heces por el método de Folch. Es importante mencionar que durante la administración de este extracto, los animales presentaron abundante diarrea grasa (esteatorrea). Es posible que *in vivo* el extracto hexánico de *H. philonotis* este inhibiendo a la lipasa pancreática.

La actividad inhibitoria de la lipasa puede ser un mecanismo adicional para poder explicar la actividad antiobesidad de *H. silenoides* e *H. philonotis*. Yun en el año 2010, reportó que las saponinas, polifenoles, flavonoides y cafeína inhiben a la lipasa pancreática. El género *Hypericum* contiene un gran número de constituyentes químicos con actividad biológica documentada (Lavie *et al.*, 1995) incluyendo a los compuestos reportados por Yun (2010). A pesar de que la rutina, quercetina, hiperforina y ácido clorogénico se identificaron en los extractos acuosos de ambas especies de *Hypericum* (Figura 10), estos compuestos no inhibieron a la lipasa pancreática (Gráfica 10). Sin embargo es probable que los compuestos reportados por Yun (201) estén presentes en las dos especies de *Hypericum* evaluadas y que dichos compuestos sean los responsables de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática porcina.

El desarrollo de moléculas inhibitorias de la absorción de nutrientes, es una de las estrategias más promisorias en la búsqueda de nuevos fármacos antiobesidad. Debido a que ofrecen la reducción del consumo energético, sin alterar mecanismos primordiales del organismo (Birari y Bhutani, 2007). Hoy en día es un hecho que los productos naturales están siendo evaluados como posibles agentes inhibitorias de la lipasa pancreática; siendo el mecanismo farmacológico más estudiados en la actualidad (Yun, 2010).

La obesidad es un padecimiento crónico, que se caracteriza por la acumulación de tejido adiposo (Hensrud y Klein, 2006). El tejido adiposo está constituido por el tejido adiposo blanco y pardo. Desde el punto de vista funcional, se ha considerado al tejido adiposo blanco como un depósito de energía, en cambio el

tejido adiposo desempeña una función termogénica y tal vez amortiguadora de ingresos energéticos excesivos (Björntorp, 1992; Cannon y Nedergaard, 2004).

En el TAB los lípidos se almacenan en un solo compartimento (locus), en el interior de las células como una gran gota citoplasmática. Es el más abundante del organismo humano adulto y por lo tanto el mayor reservorio energético, se forma de los triglicéridos. En contraste el TAP es el encargado de la termogénesis, su color se debe por la gran cantidad de mitocondrias que posee (Westerterp, 2004; Clapman, 2012; Morrison *et al.*, 2012). La dieta de cafetería incrementó el depósito de grasa a costa de la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo; es decir la dieta incrementó la cantidad de tejido adiposo blanco (700%) y activó el desarrollo del tejido adiposo pardo (Cuadro 16 y 17).

En contraste el tratamiento con los extractos de *H. silenoides* presentó un efecto termogénico. Siendo el extracto acuoso el más activo, en este caso el TAB disminuyó un 80% y el TAP disminuyó un 75%. En cambio el tratamiento con el extracto acuoso de *H. philonotis* solamente disminuyó el TAB y TAP en 60% y 57% respectivamente. El TAP es el encargado de la termogénesis, su color es debido a la gran cantidad de mitocondrias que posee. Se estimula por el frío o por dietas con alto contenido calórico. La termogénesis facultativa o adaptativa, que es el calor producido en respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica, es regulado por el sistema nervioso simpático. La termogénesis adaptativa se produce en músculo (tiriteo, contracciones musculares involuntarias) y tejido adiposo marrón (no tiriteo) (Clapham, 2012).

Los fármacos termogénicos son más conocidos como “quemadores de grasas”, y actúan elevando la temperatura a través del sistema nervioso simpático, disminuyendo el apetito y aumentando el gasto energético (Cannon y Nedergaard, 2004). El fármaco de referencia (sibutramina) también disminuyó significativamente el tejido adiposo. El mecanismo de acción de la sibutramina es doble; por una parte favorece la saciedad, disminuyendo la ingesta de alimentos, y por otra estimula la termogénesis, aumentando el gasto energético (Lean, 2001). Al igual que la sibutramina, los extractos de las especies de *Hypericum* estudiadas, presentaron un mecanismo de acción doble anoréxico y termogénico.

La obesidad surge cuando el exceso de energía, en forma de triglicéridos, se acumula en el tejido adiposo. Simultáneamente estos triglicéridos pueden acumularse en tejido no adiposo, tales como el músculo, hígado, páncreas, riñón y corazón (van Herpen y Schrauwen-Hinderling, 2008). La excesiva acumulación de lípidos en el citoplasma celular provoca disfunción o muerte celular, proceso conocido como lipotoxicidad. (van Herpen y Schrauwen-Hinderling, 2008).

La administración de la dieta de cafetería, incrementó la acumulación de ácidos grasos saturados en el corazón, hígado, riñón y músculo (tejido no adiposo), en otras palabras desencadenó un proceso de lipotoxicidad. Hoy en día sabemos que cuando se sobrepasa la capacidad de almacenamiento de las grasas o se alteran los mecanismos que la regulan, la propia dieta genera una situación metabólica desfavorable o tóxica. Como consecuencia los triglicéridos, se acumulan de forma ectópica en el hígado y músculo, produciendo diferentes grados de resistencia a la insulina y síndrome metabólico, con el consiguiente incremento de morbilidad cardiovascular (Mittendorfer, 2011)

Los tejidos provenientes de animales obesos, presentaron gran cantidad de ácidos saturados. Por ejemplo el *ácido palmítico* (C16:0) es el principal ácido graso saturado de la dieta, constituye aproximadamente el 60% de los mismos. Es el ácido graso más abundante en las carnes y grasas lácteas (mantequilla, queso y nata). Es el *ácido graso menos saludable*, pues aumenta los niveles de colesterol en la sangre, por lo que es el más aterogénico; es decir aumenta el riesgo de padecer aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y cerebrovascular (Chow, 2008). Otro ácido identificado fue el *ácido esteárico* (C18:0), la presencia de este ácido contribuye a que los niveles séricos de los triglicéridos aumenten. Por su parte el aumento del *ácido palmitoleico* (C16:1 $\omega$ 7), se presenta cuando la ingesta de ácidos grasos esenciales es escasa. Es por ello que los niveles elevados de ácido palmitoleico es un marcador de deficiencia de ácidos grasos esenciales (Chow, 2008).

Cabe destacar el incremento del *ácido linoleico* (C16:2 $\omega$ 6) en los animales alimentados con una dieta de cafetería. Es el ácido poliinsaturado más abundante en la mayoría de los tejidos humanos, es un ácido graso esencial, y los niveles bajos pueden llevar a una gran variedad de síntomas como lo son la falta de producción de eicosanoides, los cuales son reguladores celulares. Sin embargo un exceso del ácido linoleico puede contribuir a un proceso de inflamación (Steinkam *et al.*, 2000).

Por su parte el colesterol y el ácido araquidónico identificados en el corazón de los animales obesos generaron un proceso de lipotoxicidad. El ácido araquidónico está relacionado con procesos de inflamación, ya que promueve la síntesis de prostaglandinas (Berg y Scherer, 2005). Adicionalmente los niveles altos promueven la formación de cálculos biliares, al estimular la producción de mucina en la mucosa de la vesícula biliar (Hayes *et al.*, 1992).

La dieta de cafetería favoreció un proceso de lipotoxicidad mientras que *H. silenoides* revirtió esta disfunción celular, es decir los animales tratados con el extracto acuoso de *H. silenoides*, disminuyeron significativamente la cantidad de ácidos grasos saturados (palmítico, mirístico y esteárico). La disminución de la cantidad y tipo de grasas en los tejidos adiposos y no adiposos, sugiere que el extracto

acuoso de *H. silenoides* esté actuando como un regulador del metabolismo de lípidos es decir sobre la lipólisis. Hoy en día se está estudiando a la lipólisis, como un blanco farmacológico para el tratamiento de la obesidad. Una de las estrategias es estimular la hidrólisis de los triglicéridos para disminuir las reservas de grasas. Esta opción requiere la oxidación de los ácidos grasos recién liberados y el desarrollo de agonistas adrenérgicos  $\beta_3$  (Yun, 2010).

Mediante el análisis por CG-EM se encontró ácido ricinoleico (12-OH18:1 9c) en el tejido adiposo blanco de animales tratado con el extracto acuoso de *H. silenoides* a la dosis de 100 mg/kg (Cuadro 18). Desde tiempos faraónicos, se ha utilizado este ácido como purgante. El mecanismo de acción del compuesto es a través de inactivar la síntesis proteica, el efecto se basa por una parte en la acumulación de agua en el intestino, y por otra en la irritación de la mucosidad que aceleran el vaciado del sistema intestinal (Akoh y Min, 2002). La presencia de ácido ricinoleico en el TAB, sugiere que este compuesto forma parte de la composición química de *H. silenoides* y contribuye a que se presente diarrea durante el tratamiento y la pérdida de peso corporal se vea favorecida.

El tejido adiposo está constituido por adipocitos y tejido intercelular. Los primeros están adaptados para almacenar (y liberar) ácidos grasos bajo la forma de triglicéridos, reunidos en una gota citoplasmática única (Blüher, 2009). La obesidad surge cuando el exceso de energía en forma de triglicéridos se acumula en el adipocito, incrementando su tamaño (hipertrofia) e induciendo la aparición de nuevos adipocitos (hiperplasia) como resultado de un aumento en la diferenciación de células adiposas precursoras (preadipocitos) (Blüher, 2009).

En el presente trabajo una dieta de cafería originó un incremento en el número de adipocitos pardos y blancos (hiperplasia) y un incremento en su tamaño (hipertrofia). El tratamiento con *H. silenoides* revirtió la hiperplasia y la hipertrofia provocada por una dieta hipercalórica. En otras palabras el tratamiento durante 35 día con el extracto acuoso de *H. silenoides* disminuyó significativamente el área y número de los adipocitos blancos y pardos. El mecanismo por el cual *H. silenoides* provoca la disminución de los adipocitos es desconocido, sin embargo al igual que *H. perforatum*, quizás *H. silenoides* sea capaz de inhibir la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros. Otros mecanismos alternos pueden ser a través de la deslipidación y/o mediante apoptosis (Della-Fera *et al.*, 2001).

El análisis químico de los extractos acuosos de *H. silenoides* e *H. philonotis* por HPLC, indicó la presencia de hiperforina, rutina, ácido clorogénico y quercetina. A pesar de que estos compuestos no presentaron actividad sobre la inhibición de las lipasas *in vitro*, no se descartan como parte de los compuestos antiobesidad de *H. silenoides* e *H. philonotis*. Estudios recientes demostraron que la

administración oral de *ácido clorogénico* (30 ó 60 mg/kg) durante 14 días disminuyó el peso corporal de ratones alimentados con una dieta hiperlipidémica (16%); adicionalmente la cantidad de tejido adiposo epididimal (46%) también fue abatida. En otras palabras, estos autores demostraron la actividad antiobesidad del ácido clorogénico (Cho *et al.*, 2010).

En un estudio reciente se evaluó la actividad antiobesidad de la quercetina (Ahn *et al.*, 2008). Los investigadores encontraron que la administración *in vitro* de quercetina (10, 50 ó 100  $\mu$ M) inhibe la adipogénesis, evita la acumulación de lípidos en el citoplasma de adipocitos y causa apoptosis en la línea celular 3T3-L1 (Ahn *et al.*, 2008). Por su parte la administración oral de rutina (50 ó 100 mg/kg) durante 8 semanas detiene el incremento del peso corporal en animales alimentados con una dieta hiperlipídica. Así mismo el tamaño del hígado, el tejido adiposo del peritoneo, los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, insulina y leptina disminuyen con el tratamiento con este flavonoide. Los autores sugieren que la administración de rutina, puede ser útil en el tratamiento de dislipidemias, hepatoesteatosis y estrés oxidativo (Hsu *et al.*, 2009).

Continuando con el estudio de la composición química de *H. silenoides* e *H. philonotis*, los aceites esenciales fueron analizados por CG-EM. Los compuestos más abundantes de *H. silenoides* fueron *n*-nonano (11.8%), 1-tridecanol (11.6%) y *n*-dodecanal (10.5%). En contraste, los compuestos mayoritarios detectados en *H. philonotis* fueron 2-metil octano (52.7%), *n*-nonano (35.9%) y  $\beta$ -pineno (3.5%). Esta composición química está de acuerdo con estudios previos de aceites esenciales provenientes de *H. perforatum* L., *H. tetrapterum* Fries, *H. olympicum* L. (Pavlović, 2006), *H. scabrum* L. (Morteza-Semnani *et al.*, 2006), *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht., *H. carinatum* Griseb., *H. connatum* Lam., *H. myrianthum* Cham. & Schlecht., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt., *H. ternum* A. St. Hil (Ferraz *et al.*, 2005).

El aceite esencial de *H. philonotis*, presentó en gran proporción alcanos (33.3%), mientras que en *H. silenoides* estos solo estuvieron presentes en un 16.7%. En contraste, *H. silenoides* fue caracterizado por el alto contenido de monoterpenos oxigenados. El 2-metiloctano y el *n*-nonano fueron los compuestos dominantes en ambos aceites. Estos compuestos han sido encontrados como compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *H. perforatum* L. (Mathis y Ourisson, 1964 a, b) e *H. foliosum* Aiton (Santos *et al.*, 1999), respectivamente. El compuesto 2-hexenal presente en *H. silenoides* e *H. philonotis*, ha sido encontrado muy raramente en el género *Hypericum*. La presencia de este compuesto destaca en *H. scabrum* L. (Morteza-Semnani *et al.*, 2006) e *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht. (Ferraz *et al.*, 2005). Este aldehído es uno de los productos de la actividad de las lipoxigenasas (Dudareva *et al.*, 2006) y es bien conocido que se produce en las plantas como respuesta a algún daño (Matsui, 2006). La presencia del 2-

hexenal parece estar asociado con los cortes hechos en el material vegetal, ya que se encuentra en un porcentaje bajo (0.1-0.5%).

Es de suma importancia demostrar que el extracto acuoso de *H. silenoides* presenta actividad antiobesidad por diferentes mecanismos farmacológicos como los son anoréxico, antidepresivo, hipolipídico, hipoglucemiante, regulador del metabolismo de lípidos y termogénico, ya que antes de realizar el presente trabajo no se habían realizados estudios formales, que den un sustento científico al uso tradicional que se le da a esta planta. Otra de las aportaciones importantes del presente trabajo es el hecho de que el *H. silenoides* inhibe la lipasa pancreática *in vivo* e *in vitro*. También se demostró que el género *Hypericum* puede ser empleado para el tratamiento de la obesidad en especial las especies mexicanas *H. silenoides* e *H. philonotis*.

Este es el primer informe donde se reporta que la hiperforina, ácido clorogénico, rutina y quercetina, forman parte de la composición química de *H. silenoides* e *H. philonotis*. Agregando a lo anterior también es el primer estudio químico que se realiza a los aceites esenciales de estas dos especies de *Hypericum* mexicanas en la etapa de floración. El haber encontrado que el género *Hypericum* posee actividad antiobesidad por diferentes mecanismos de acción, desde el punto de vista terapéutico, indica que *H. silenoides* e *H. philonotis*, pueden ser utilizadas como materia prima para la fabricación de fitomedicamentos auxiliares en el tratamiento de la obesidad. Queda abierta la investigación para continuar el estudio de estas plantas y postular compuestos marcadores para el desarrollo de una metodología analítica para un control de calidad.

## IX. CONCLUSIONES.

- Se implementó una dieta de cafetería, basada en alimentos mexicanos, con la cual fue posible el desarrollo de obesidad tipo I en ratas Wistar macho.
- El extracto acuoso de *H. silenoides* y el diclorometánico de *H. philonotis* mostraron la mayor actividad antiobesidad en ratas alimentadas con una dieta de cafetería.
- El extracto acuoso de *H. silenoides* presentó diferentes efectos farmacológicos como lo son anoréxico, antidepresivo, hipolipidémico e hipoglucemiante. También disminuyó la cantidad de ácidos grasos saturados en tejido adiposo y no adiposo, lo que sugiere la regulación del metabolismo de lípidos; además presentó actividad termogénica por la disminución del tejido adiposo pardo y revirtió la hiperplasia e hipertrofia de adipocitos blancos y pardos. El mecanismo también incluyó la inhibición de la lipasa pancreática *in vivo* e *in vitro*. Por lo que el efecto antiobesidad de *H. silenoides* es por diferentes mecanismos farmacológicos.
- La actividad antiobesidad del extracto diclorometánico de *H. philonotis* se llevo a cabo por diferentes mecanismos de acción, principalmente actúa como anoréxico, hipoglucemiante, termogénico e inhibidor de la lipasa pancreática porcina *in vitro*, de la misma manera que *H. silenoides*.
- Se encontró la presencia de hiperforina, ácido clorogénico, rutina y quercetina en los extractos acuosos de *H. silenoides* e *H. philonotis* por cromatografía de líquidos. Estos compuestos no fueron activos como inhibidores de la lipasa pancreática porcina *in vitro*.
- La composición de los aceites esenciales de *H. silenoides* e *H. philonotis* es común con otras especies de *Hypericum* siendo el 2-metil octano, *n*-nonano,  $\beta$ -pineno, *n*-decano, *n*-decanal, cariofileno y nerolidol, compuestos comunes en las dos especies estudiadas.
- Las similitudes y diferencias entre los aceites esenciales de *H. silenoides* e *H. philonotis*, podrían ser útiles para la identificación de marcadores taxonómicos. Sin embargo, para una correcta diferenciación de estas especies, a través del análisis de los aceites esenciales, se debe de considerar una posible variación en los niveles de los principales componentes químicos debido a las condiciones edafológicas y la edad de las muestras a la hora de su colecta.
- Finalmente este trabajo es el primer informe químico y farmacológico donde se reporta que *H. silenoides* e *H. philonotis* presentan actividad antiobesidad en ratas alimentadas con una dieta de cafetería.

## X. PERSPECTIVAS.

- Evaluar *in vitro* al extracto acuoso de *H. silenoides* como inhibidor de la diferenciación del adipocito empleando una línea celular de preadipocitos (fibroblastos 3T3-L1).
- Cuantificar el gasto energético generado por la administración de *H. silenoides* midiendo directamente por métodos físicos (calorimetría directa) o estimando el gasto a través del consumo de O<sub>2</sub> y exhalación de CO<sub>2</sub> (calorimetría indirecta).
- Evaluar al extracto acuoso de *H. silenoides* como activador de la lipólisis es decir como un agonista selectivo del receptor  $\beta_3$ -adrenérgico.
- Evaluar la rutina, quercetina, ácido clorogénico e hiperforina *in vivo* en el modelo de obesidad tipo 1 propuesto en este trabajo.
- Realizar el estudio biodirigido del extracto acuoso de *H. silenoides* para identificar a sus compuestos activos.
- Evaluar a las fracciones y compuestos obtenidos del extracto acuoso de *H. silenoides* en el modelo de obesidad producido por la ingesta de una dieta de cafetería.
- Evaluar a los compuestos mayoritarios del aceite esencial como agentes antiobesidad en modelos *in vivo* e *in vitro*.
- Proponer el desarrollo de un medicamento herbolario que contengan los principios más activos, sin los principios tóxicos que contiene el extracto hexánico

## XI. BIBIOGRAFÍA.

1. Adams RP. (1989). Identification of Essential Oil Components by ion trap mass spectrometry. Academic Press, New York.
2. Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. (2008). The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*; 373:545-549.
3. Ahrén B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion – Implications for health and disease. *Diabetology*; 43:393-410.
4. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. (1992). Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*; 12:207-233.
5. Alireza M. (2012). Antimicrobial activity and Chemicals composition of Essentials oils of four *Hypericum* from Khorasam Iran. *J Med Plants Res*; 6:2478-2587.
6. Allison DB, Fontaine KR, Manson, JE, Stevens J, Vanitallie TB. (1990). Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA*; 282, 1530-1538.
7. Apaydin S, Zeybek U, Ince I, Elgin G, Karamenderes C, Tuğlular I, (1999). *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits antinociceptive activity in the mouse. *J Ethnopharmacol*; 6:307-312.
8. Argilés JM. (1989). The obese Zucker rat: a Choice for fat metabolism. 1968-1988: Twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. *Prog Lip Res*; 28:53-66.
9. Avato P. (2005). A survey on the *Hypericum* genus: Secondary metabolites and bioactivity. En: Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Products Chemistry, vol. 30. Bioactive Natural Products (Part K), Elsevier, pp. 603-634.
10. Ayan A, Cirak C, Kevseroglu K, Ozen T. (2004). Hypericin in some *Hypericum* species from Turkey. *Asian J Plant Sci*; 3:200-202.
11. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. (2001). St. John's Wort (*H. perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol*; 53:583-600.
12. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández B, Flores M, Durazo AR. (2009): Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from the Mexican Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex*; 51:S595-S603.
13. Bartness TJ y Song CK. (2007). Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. The *J Lipid Res*; 48:1655-1672.
14. Bender DA (2009). Overview of metabolism & the provision of metabolic fuels, in: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA, eds. *Harper's illustrated biochemistry*. New York:MacGraw-Hill Companies, Inc.: 231–236.

15. Berg AH y Scherer PE. (2005). Adipose Tissue, Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circ Res*; 96:939-949.
16. Birari RB y Bhutani KK. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*;12:879-888.
17. Björntorp P. (1992). Abdominal fat distribution and the metabolic syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol*; 20:S26-S28.
18. Blüher M. (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diab*; 117:241-250.
19. Bombardelli E y Morazzoni P. (1995). *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*; 66:43-68.
20. Braswell AG y Ahmed J. (1999). Method for controlling weight with *Hypericum perforatum* and *Garcinia Cambogia*. United States Patent Number; 5:911-992.
21. Bray GA, York DA, Fisler JS. (1990). Experimental obesity: A homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. *ViTAPHorm*; 45:1-125.
22. Brenner R, Azbel V, Madhusoodanan S, Pawlowska M. (2000). Comparison of an extract of *Hypericum* (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: A double blind, randomized pilot study. *Clin Ther*; 22:411-419.
23. Briskin DP. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol*; 124:507:514.
24. Brockmann H y Sanne W. (1957). Zur kenntnis des Hypericins und Pseudohypericins. *Chem Ber*; 90:2480-2491.
25. Buendía-Sánchez E. (2000). El hipérico en el tratamiento de la depresión. *Revista de Fitoterapia*; 1:37-42.
26. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsenc B, Parris B, Dubosec D, Ruizc D, Saledac J, Martinez M, Carillo L, Walkera K, Kuhlmana A, Townesmith A. (2011). Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J Ethnopharmacol*; 137:121-140.
27. Butterweck V, Petereit F, Winterhoff H, Nahrsted A. (1998). Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*; 64:291-294.
28. Butterweck V, Wall A, Liefländer-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. (1997). Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*; 30:117-124.
29. Cakir A, Mavi A, Yildirim A, Duru ME, Harmandar M, Kazaz C. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol*; 87:73-83.

30. Cam H, Ren D, Leff A. (2002). Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends Mol Med*; 8:442-447.
31. Cannon B y Nedergaard (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*; 84:277-359.
32. Carek PJ y Dickerson LM. (1999). Current Concepts in the Pharmacological Management of Obesity. *Drugs*; 57:883-904.
33. Cervo L, Rozio M, Ekalle-Soppo CB, Guiso G, Morazzoni P, Caccia S. (2002). Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. *Psychopharmacology*; 164:423-428.
34. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol*; 48:937-943.
35. Chow CK. (2008). Fatty acids and their health implications. CRC Press Taylor and Francis Group, LLC. USA. 713-1257.
36. Clapman JC. (2012). Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology*; 63:11-123.
37. COFEPRIS (2010). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos sanitarios-Disponible en <http://www.cofepris.gob.mx/Lists/NotasPrincipales/DispForm.aspx?ID=20> consultado del 20 de Junio de 2012.
38. Connolly HM, Crary JL, McGoon MD, Hensrud DD, Edwards BS, Edwards WD. (1997). Valvular heart disease association with fenfluramine-phentermine. *New Engl J Med*; 337:581-588.
39. Couladis M, Chinou IB, Tzakou O, Petrakis PV. (2003). Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. Apollinis (Boiss. & Heldr.). *Phytother Res*; 17:152-154.
40. Cox PA. (2000). Hill tribal knowledge survives the millennium. *Science*; 287:44-45.
41. Crockett SL y Robson KB. (2011). Taxonomy and chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Medicinal Aromatic Plant Sci Biotech*; 5:1-13.
42. Crowther NJ. (2009). Factors predisposing to obesity: a review of the literature. *JEMDSA*; 14:81-84.
43. Daudt R, von Poser, GL, Neves G, Rates SMK. (2000). Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytother Res*; 14:344-346.
44. Decosterd L, Hoffmann E, Kyburz R, Bray D, Hostettmann K. (1991). A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta med*; 57:548-551.
45. Della-Fera, Qian H, Baile CA. (2001). Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin. *Diabetes Obes Metab*; 3:299-310.

46. Devlin MJ, Yanovski SZ, Wilson GT. (2000). Obesity: what mental health professionals need to know. *Am J Psychiatry*; 157:854–866.
47. Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA. (2001). St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol Sci*; 22:292-297.
48. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci*; 25:417-440.
49. Falcou R, Bouilland F, Mory G, Apfelbanm M, Ricquier D. (1985). Increase of uncoupling protein and its mRNA in brown adipose tissue of rats fed on cafeteria diet. *Biochem J*; 231:241-244.
50. FDA (2012). FDA approves Belviq to treat some overweight or obese adults. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm309993.htm>
51. Ferraz ABF, Limberger RP, Bordignon SAL, von Poser GL, Henriques AT. (2005). Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. *Flavour Fragrance J*; 20:335-339.
52. Ferrer-Lorente R, Cabot C, Fernández-López JA, Remeser X, Alemany M. (2005). Effects oleylestrone with dexfenfluramine, sibutramine or phentermine overweight rats. *Eur J Pharmacol*; 513:243-258.
53. Feve B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 19:483-499.
54. FHEUM. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2001). Secretaría de Salud. México. Segunda edición.
55. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. (2002): Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999- 2000. *JAMA*; 288, 1723-1727.
56. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. (2005). Excess deaths associated with underweight, overweight and obesity. *JAMA*; 293, 1861-1867.
57. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. (2007). Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight and obesity. *JAMA*; 298, 2028-2037.
58. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*; 266:497-509.
59. Fujioka K. (2002). Management of obesity as a chronic disease: nonpharmacologic, pharmacologic and surgical options. *Obes Res*; 10:116S–123S.
60. García-García E, Kaufer-Horwitz M, Pardío J, Arroyo P. (2010). La Obesidad. Perspectivas para su comprensión y tratamiento. Editorial Medica panamericana. México, pp. 21-25.
61. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*; 131:242-256.
62. Gianotti M, Roca P, Palou A. (1990). The effects of cafeteria diet induced obesity on rat blood

amino acid compartmentation. *Arch Int Physiol Biochim*; 98:155-161.

63. Gideon R, Hajer GR, van-Haeften TW, Visseren FLJ. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes and vascular diseases. *Eur Heart J*; 29:2959–2971.
64. Gilon P y Henquin JC. (2007) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta cell function. *Endocr Rev*;43:393-410.
65. Gnerre C, von Poser GL, Ferraz A, Viana A, Testa B, Rates SMK. (2001). Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *J Pharm Pharmacol*; 53:1273-1279.
66. González-Castejón M y Rodríguez-Casado. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacol Res*; 64:438-455.
67. Greeson JM, Sanford B, Monti DA. (2001). St John's wort (*H. perforatum*): A review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*; 153:402-414.
68. Gregoire F. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med*; 226:997-1002.
69. Hao R, Yuan L, Zhang N, Li C, Yang J. (2012). Brown adipose tissue: distribution and influencing factors on FDG PET/CT scan. *J Pediatr Endocrinol Metab*; 25:233-237.
70. Haslam DW y James WPT. (2005). Obesity. *Lancet*; 366:1197-1209.
71. Haupman JB, Jeunet FS, Hartmann D. (1992). Initial studies in humans with the novel gastrointestinal inhibitor Ro.18-04678 (tetrahydrolipstatin). *Am J Clin Nutr*; 55:309S-313S.
72. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*; 2:239-254.
73. Hayes KC, Livingston A, Trautwein EA. (1992). Dietary impact on biliary lipids and gallstones, *Annu Rev Nutr*;12:299-326.
74. Hersch-Martínez (1996). “*Destino común: los recolectores y su flora medicinal*. El comercio de flora medicinal silvestre desde el sur-occidente poblano. Instituto Nacional de Antropología e Historia”. pp. 122, 148, México.
75. Heilmann J, Winkelmann K, Sticher O. (2003). Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *H. species*. *Planta Med*; 69:202-206.
76. Hensrud DD y Klein S. (2006). Extreme Obesity. A New Medical Crisis in the United States. *Mayo Clin Proc*; 81:S5-S10.
77. Hosni K, Msaada K, Taârit MB, Marzouk B. (2011). Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochem Syst Ecol*; 39:43-50.
78. Hsu CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC. (2009). Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *J Agric Food Chem*; 52:425-431.

79. Husain GM, Chatterjee SS, Singh PN, Kumar V. (2011). Hypolipidemic and antiobesity-like activity of standardised extract of *Hypericum perforatum L.* in rats. *ISRN Pharmacology* vol., Article ID 505247, 7 pages, 2011. doi:10.5402/2011/505247.
80. Husain GM, Singh PN, Kumar V. (2008) Anti-diabetic activity of Indian *Hypericum perforatum L.* on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*; 3:889–894.
81. Husain GM, Singh PN, Kumar V. (2009). Beneficial effects of a standardised *Hypericum perforatum* extract in rats with experimentally induced hyperglycemia. *Drug Discov Ther*; 3:215–220.
82. Ikonen E. (2006). Mechanisms for cellular cholesterol transport: Defects and human disease. *Physiol Rev*; 86:1237-1261.
83. Jacobson DA y Philipson LH (2007). TRP channels of the pancreatic beta cells. *Handb Exp Pharmacol*; 179:409-424.
84. Jayasuriya H, Clark AM, Mc Chesney JD. (1991). New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. *J Nat Prod*; 54:1314-1320.
85. Kitanov GM. (2001). Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem Syst Ecol*; 29:171-178.
86. Laakmann G, Schüle C, Baghai T, Kieser M. (1998). St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*; 31;54-59.
87. Lam DD, Garfield AS, Martston OJ, Shaw J, Heisler LK. (2010). Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharma Biochem Beh*; 97:84-91.
88. Lara A, Berber A, Aguilar-Salinas CA. (2008). Cost of obesity in Mexico with stress in type 2 diabetes mellitus and hypertension.
89. Lavie G, Mazur Y, Lavie D, Prince AM, Pascual D, Liebes L, Levin B, Meruelo D. (1995). Hypericin as an inactivator of infectious viruses in blood components. *Transfusion*; 35:392-400.
90. Lean ME. (2001). How does sibutramine work?. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 25:S8-S11.
91. Lee YP, Chung GH, Rhee JS. (1993). Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*; 1169:156–164.
92. Leibel RL, Chung WK, Chua SC. (1997). The molecular genetics of rodent single gene obesity. *J Biol Chem*; 272:31937-31940.
93. Leuner K. (2007). Hyperforin – a key constituent of St. John’s wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb J*; 21:4101-4111.
94. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*; 23:201-229.
95. Lladó I, Pico C, Palou A, Pons A. (1995). Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese diet. *Physiol Behav*; 58: 513–519.

96. Lladó I, Pons A, Palou A. (1999). Effects of fasting on lipoprotein lipase activity in different depots of white and brown adipose tissues in diet-induced overweight rats. *J Nutr Biochem*; 10:609-614.
97. Long Towell J y Attolini Lecón A. (2009). Caminos y mercados de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Históricas/Instituto Nacional de Antropología e Historia.
98. Lynch MJ. (1972). Métodos de laboratorio. Editorial Nueva Interamericana. México. pp. 1181-1201.
99. MacNeel W y Goa KL. (1998). Sibutramine: a review its contribution to the management of obesity. *Drugs*; 56:1093-1124.
100. Maggi F, Ferretti G, Pocceschi N, Menghini L, Ricciutelli M. (2004). Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. *Fitoterapia*; 75:702-711.
101. Makovetskaya EY y Maksiutina NP. (1991). Comparative chromatographic examination of *Hypericum* species growing in Ukraine. *Farm Zh (Kiev)*; 20:63-65.
102. Martínez-Alfaro MA, Oliva VA, Mendoza Cruz M, Morales Garcia G, Toledo Olazcoaga G y Wong León A (2001). Catalogo de plantas utiles de la sierra norte de Puebla, México. UNAM. Instituto de Biología. México.
103. Mathis C y Ourisson G. (1964 a). Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*-II. Identification de constituants de diverses Huiles essentielles D'Hypericum. *Phytochem*; 3:115-131.
104. Mathis C y Ourisson G. (1964 b). Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*-III. Identification de constituants de diverses Huiles essentielles D'H. *Phytochem*; 3:133-141.
105. Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol*; 9: 274-280.
106. Meckes M, Villareal ML, Tortoriello J, Berlin P, Berlin EA. (1995). A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytother Res*; 9:244-250.
107. Medina MA, Martínez-Poveda BM, Amores-Sánchez MI, Quesada AR (2006). Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?. *Life Sci*; 79:105-111.
108. Mendoza-Castelán G y Lugo-Pérez R. (2011). Plantas medicinales en los mercados de México. UAM., pp 54, México.
109. Mittendorfer B. (2011). Origins of metabolic complications in obesity: adipose tissue and free fatty acid trafficking. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 14:535-41.
110. Moro CO y Basile G. (2000). Obesity and medicine. *Fitoterapia*; 71:S73:S82.
111. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. (2012). Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front endocrinol*; 3:1-19.

112. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Changizi S. (2006). The essential oil composition of *Hypericum scabrum* L. from Iran. *Flavour Fragrance J*; 21:513-515.
113. Mukherjee PK, Suresh B, Verpoorte R. (2001). CNS active potentials of some *Hypericum* species of India. *Phytomedicine*; 8:331-337.
114. Mukherjee PK, Verpoorte R, Suresh B. (2000). Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *J Ethnopharmacol*; 70:315-321.
115. Müller WE. (2003). Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res*; 47:101-109.
116. Muñoz-Rivas, N. (2011). Ensayo randomizado multicéntrico de lorcaserina frente a placebo en el manejo del sobrepeso y obesidad. *Rev Clin Esp*; 211:52-53.
117. Nahrstedt A y Butterweck V. (1997). Biologically active and other chemical constituents of the herb of *H. perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*; 30:129-134.
118. Naim M, Brand JG, Kare MR, Carpenter RG. (1985). Energy intake, weight gain and fat deposition in rats fed flavored, nutritionally controlled diets in a multichoice ("cafeteria") design. *J Nutr*; 115:1447-1458.
119. Neovius M y Narbro K. (2008). Cost-effectiveness of pharmacological anti-obesity treatments: a systematic review. *Int J Obes*; 32:1752–1763.
120. NIST 08. (2008). Mass spectral library (NIST/EPA/NIH). National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA.
121. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
122. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P. (2003). Encuesta Nacional de Salud 2000. T.2: La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos: Instituto Nacional de Salud Pública.
123. Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpado-Hernández S, Henández-Ávila M, Sepúlveda-Amor J. (2006). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
124. OMS. (2002): Informe Sobre la Salud en el Mundo. Reducir los Riesgos y Promover una Vida Sana. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
125. Öztürk B, Apaydin S, Goldeli E, Ince I, Zeybek U. (2002). *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits anti-inflammatory activity in the rat. *J Ethnopharmacol*; 80:207-209.
126. Öztürk Y, Aydin S, Beis R, Hüsnü Can Baser K. (1996). Effects of *Hypericum calycinum* L. extract on the central nervous system in mice. *Phytother Res*; 10:700-702.
127. Padwal R, Li SK, Lau DC. (2003). Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a

system review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Obes Relat Metab Disord*; 27:1437-1446.

**128.** Padwal RS y Majumbar SR. (2007). Drug treatment for obesity: orlistat, sibutramine and rimonabant. *Lancet*; 329:71-77.

**129.** Pantoja JP. (2004). Tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida. *Gaceta Medica Mexicana*; 140:S85-S90.

**130.** Paredes-Salido F y Roca-Fernández JJ. (2003). El hipérico y el tratamiento de la depresión. *Offarm*; 22:108-114.

**131.** Pavlović M, Tzakou O, Petrakis PV, Couladis M. (2006). The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece. *Flavour Fragrance J*; 21:84-87.

**132.** Pearce J y Witten K. (2010). Geographies of Obesity. Environmental understanding of the obesity epidemic. MPG Books Group, pp. 3-54. Inglaterra.

**133.** Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel J, Bouchard C. (1999). The human obesity gene map: the 1998 update. *Obesity Res*; 7:111-129.

**134.** Pi-Sunyer FX. (2003). Obesity. *Endocrinol Metab Clin N*; 32:XIII-XIV.

**135.** Pichot P. DSM-IV. (1994). Diagnostic and statical manual of mental disorder. 4ta de. Washington: America Psychiatric Association pp.345-359.

**136.** Pistelli L, Bertoli A, Zucconelli S, Morelli I, Panizzi L, Menichini F. (2000). Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia*; 71: S138-S140.

**137.** Pomp D y Nielsen MK. (1999). Quantitative genetics of energy balance: lessons from animal models, *Obesity Res*; 7:106-110.

**138.** Pomp D. (1997). Genetic dissection of obesity in polygenic animal models. *Behav Genet*; 27: 285-306.

**139.** Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacody Ther*; 229:327-336.

**140.** Porsolt UD, Anton G, Blavet N, Jalife M. (1978). Behavior despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur Pharmacol*; 47:379-391.

**141.** Prats E, Monfar M, Castellá, J, Iglesias R, Alemany M. (1989). Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav*; 45:263-272.

**142.** Radusiene J, Judzentiene A, Bernotiene G. (2005). Essential oil composition and variability of *H. perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochem Syst Ecol*; 33:113-124.

**143.** Rieli-Mendes F, Mattei R, Carlini E. (2002). Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*; 73:462-471.

144. Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MAC, Stoeckli-Evans H, Hostettmann K. (1995). Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum. brasiliense*. *Phytochem*; 40:1447-1452.
145. Rodríguez-Jimenez, C. (1996). Flora del Bajío y Regiones adyacentes. Guttiferae. INECOL A.C., Mexico. 26 pp.
146. Rodríguez-Landa JF y Contreras CM. (2003). A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine*; 10:688-699.
147. Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Jiménez-Corona A, Gómez-Pérez FJ, Barquera S, Lazcano-Ponce E. (2012). Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud Publica Mex*; 54:7-12.
148. Rothwell NJ y Stock MJ. (1979). A role for brown adipose tissue in diet induced thermogenesis. *Nature*; 281:31-35.
149. Rothwell NJ y Stock MJ. (1980). Thermogenesis induced by cafeteria feeding in young growing rats. *Proc Nutr Soc*; 39:5A.
150. Roz N, Mazur Y, Hirshfeld A, Rehavi M., (2002). Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin. *Life Sci*; 71:2227-2237.
151. Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Prado B, Rabanal RM. (2005). Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. Extracts in the forced swimming test in mice. *J Ethnopharmacol*; 97:541-547.
152. Santos PAG, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJ. (1999). Composition of the essential oil of *Hypericum foliosum* Aiton from five Azorean islands. *Flavour Fragrance J*, 14:283-289.
153. Savikin K, Dobri S, Tadi V, Zduni G. (2007). Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum barbatum* Jacq., *Hypericum hirsutum* L., *Hypericum richeri* Vill. and *Hypericum androsaemum* L. in rats. *Phytother Res*; 21:176-180.
154. Schmitt AC, Ravazzolo AP, von Poser GL. (2001). Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *J Ethnopharmacol*; 77:239-245.
155. Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. (1998). Rational Phytotherapy, third edition. Springer-Verlag, New York, pp. 50-65.
156. Schulz V. (2001). Incidence and clinical relevance of the interactions and side effects of *Hypericum* preparations. *Phytomedicine*; 8:152-160.
157. Schulz V. (2002). Clinical trials with *Hypericum* extracts in patients with depression -Results, comparisons, conclusions for therapy with antidepressant drugs. *Phytomedicine*; 9:468-474.
158. Sclafani A y Springer D (1976). Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav*; 17:461-471.

- 159.** Secretaría de Salud (1993). Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC)-Epidemiología. Secretaría de Salud, México.
- 160.** Secretaría de Salud (2010). Bases técnicas del Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Secretaría de Salud. México.
- 161.** Secretaría de Salud (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). Secretaría de Salud, México.
- 162.** Smelcerovic A, Verma V, Spiteller M, Ahmad SM, Pui SC, Qazi GN. (2006). Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. *Phytochem*; 67:171-177.
- 163.** Smelcerovic A, Zuehlke S, Spiteller M, Raabe N, Özen T. (2008). Phenolic constituents of 17 *Hypericum* species from Turkey. *Biochem Syst Ecol*; 36:316-319.
- 164.** Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król Elzbieta. (2008). The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim*; 42:413-432.
- 165.** Steinkam G, Demmelmair H, Ruhl-Bagheri I, von der Hardt H, Koletzko B. (2000) Energy Supplements Rich in Linoleic Acid Improve Body Weight and Essential Fatty Acid Status of Cystic Fibrosis Patients *J of Pediatr Gastroenterol Nutr*; 31:418-423.
- 166.** Taddei-Bingas G, Santillana-Macedo M, Romero-Cancio J, Romero-Téllez M. (1999). Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública en México*; 41:216-220.
- 167.** Trovato A, Raneri E, Kouladis M, Tzakou O, Taviano MF, Galetti EM. (2001). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). *Il Farmaco*; 56:455-457.
- 168.** Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SH, Webb DA. (1968). *En Flora Europaea*, University press: Cambridge, 2:261-269.
- 169.** USP 31 NF. The United States Pharmacopeia (2007) Port City Press Baltimore USA.
- 170.** Van den Dool H y Kratz PD. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr*; 11:463-471.
- 171.** van Herpen NA y Schrauwen-Hinderling VB. (2008). Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*; 94:231-41.
- 172.** Vanaclocha B y Cañigüeral S. (2003). Hipérico. En: Fitoterapia. Vademécum de prescripción, 4ª edición, Masson, S.A., Barcelona, p. 300.
- 173.** Vasselli JR, Haraczkiwicz E, Maggio CA, Greenwood MRC. (1983). Effects of a glycosidase inhibitor (acarbose, BAY g 5421) on the development of obesity and food motivated behavior in obese Zucker (*fa/fa*) rats. *Pharm Biochem Behav*; 19:85-95.
- 174.** Vázquez-Vela ME, Torres N., Tovar AR. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in obesity. *Arch Med Res*; 39:715-728.

- 175.** Viana A, do Rego JC, von Poser G, Ferraz A, Heckler AP, Costentin J, Kuze Rates SM. (2005). The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*; 49:1042-1052.
- 176.** Wadden TA, Berkowitz RI, Womble LG, Sarwer DB, Phelan S, Cato RK, Hesson LA, Suzette Y, Osei SY, Kaplan R, Stunkard AJ. (2005). Randomized Trial of Lifestyle Modification and Pharmacotherapy for Obesity. *N Engl J Med*; 353:2111-21120.
- 177.** Weigle DS. (2003). Pharmacological Therapy of Obesity: Past, Present and Future. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:2462-2469.
- 178.** Westerterp K. (2004). Diet induced thermogenesis. *Nutr Metab*; 1:1-5.
- 179.** Wilson PW. (1994). Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens*; 7:7S-12S.
- 180.** WHO. (1995). Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization.
- 181.** York DA. (1996). Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab North Am*; 25:781-800.
- 182.** Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature (2010). A review. *Phytochem*; 71:1625-1641.
- 183.** Zevakova VA, Glyzin VI, Shemeryankina TV, Patudin AV (1991). HPLC determination of hypericins in species of St. John's wort. *Khim Prir Soedin*; 27:138.
- 184.** Zucker LM y Zucker TF. (1961). Fatty a new mutation in the rat. *J Hered*; 28:53-66.

## ANEXO 1 APROBACIÓN DEL PROTOCOLO



FACULTAD DE QUÍMICA  
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO  
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO  
OFICIO/FQ/CICUAL/020/11  
ASUNTO: Aprobación de Protocolo

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO  
DEPTO. FARMACIA  
*Presente*

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

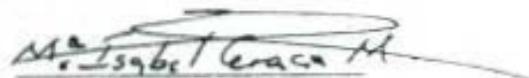
**"Estudio químico y valoración de las propiedades de Tlanchalgua (*Hypericum silenoides* Juss) para el control del sobrepeso en modelos *in vivo* e *in vitro*".**

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo,

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F. a 16 de Mayo del 2011

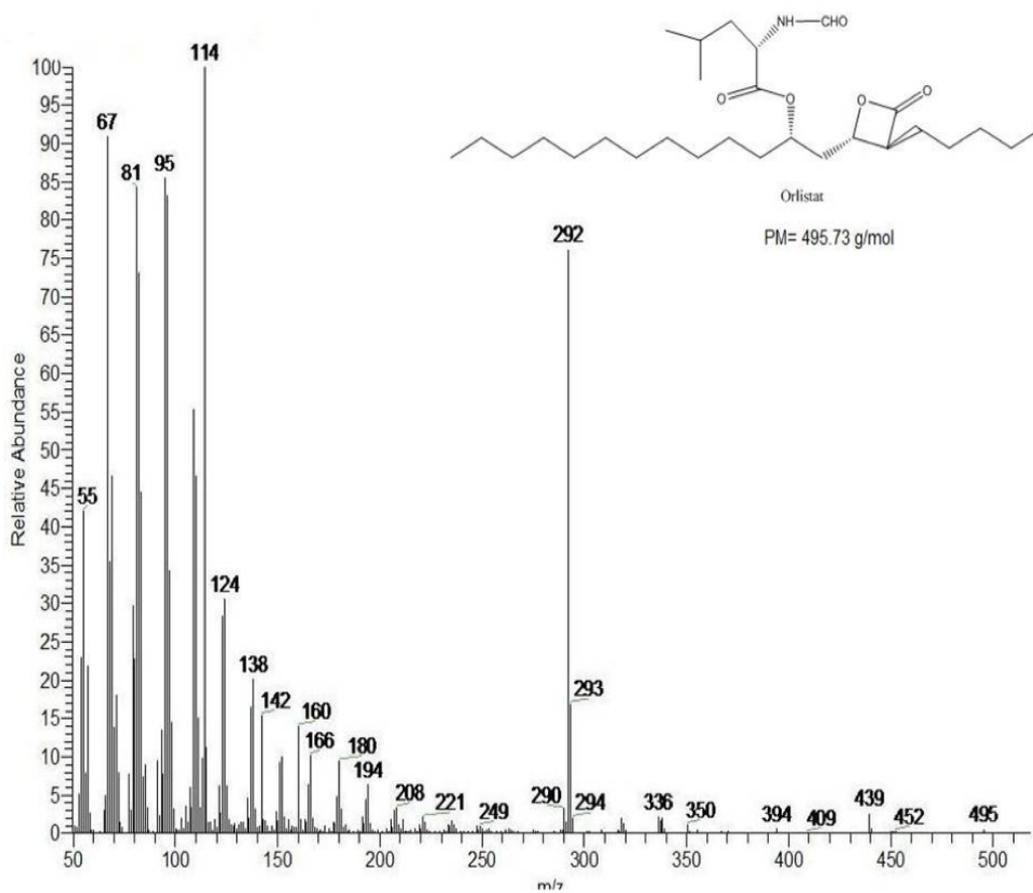
  
M. en C. Bernardo Lucas Florentino  
Coordinador del CICUAL

  
M. en C. Isabel Gracia Mora  
Secretaria del CICUAL

c.c.p. Dr. Jorge Vázquez, Secretario Académico de Investigación.  
c.c.p. CICUAL

Figura 11. Aprobación del protocolo de investigación por el CICUAL

## ANEXO 2 IDENTIFICACION DEL ORLISTAT

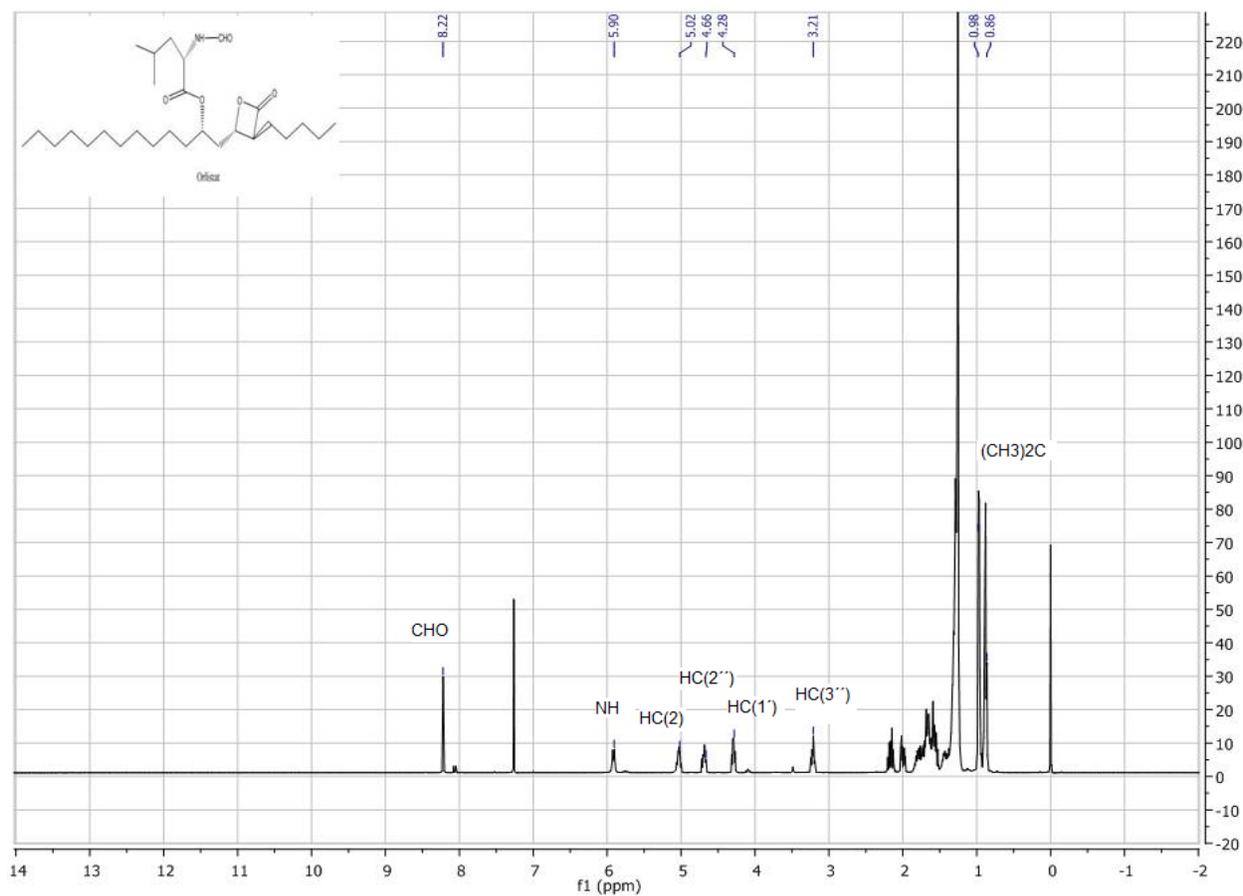


**Figura 12.** Espectro de masas de orlistat obtenido por impacto electrónico (Columna capilar DB5 de Agilet; 10 m x 0.18 mm de diámetro interno; espesor de película 0.18 µm).

Orlistat

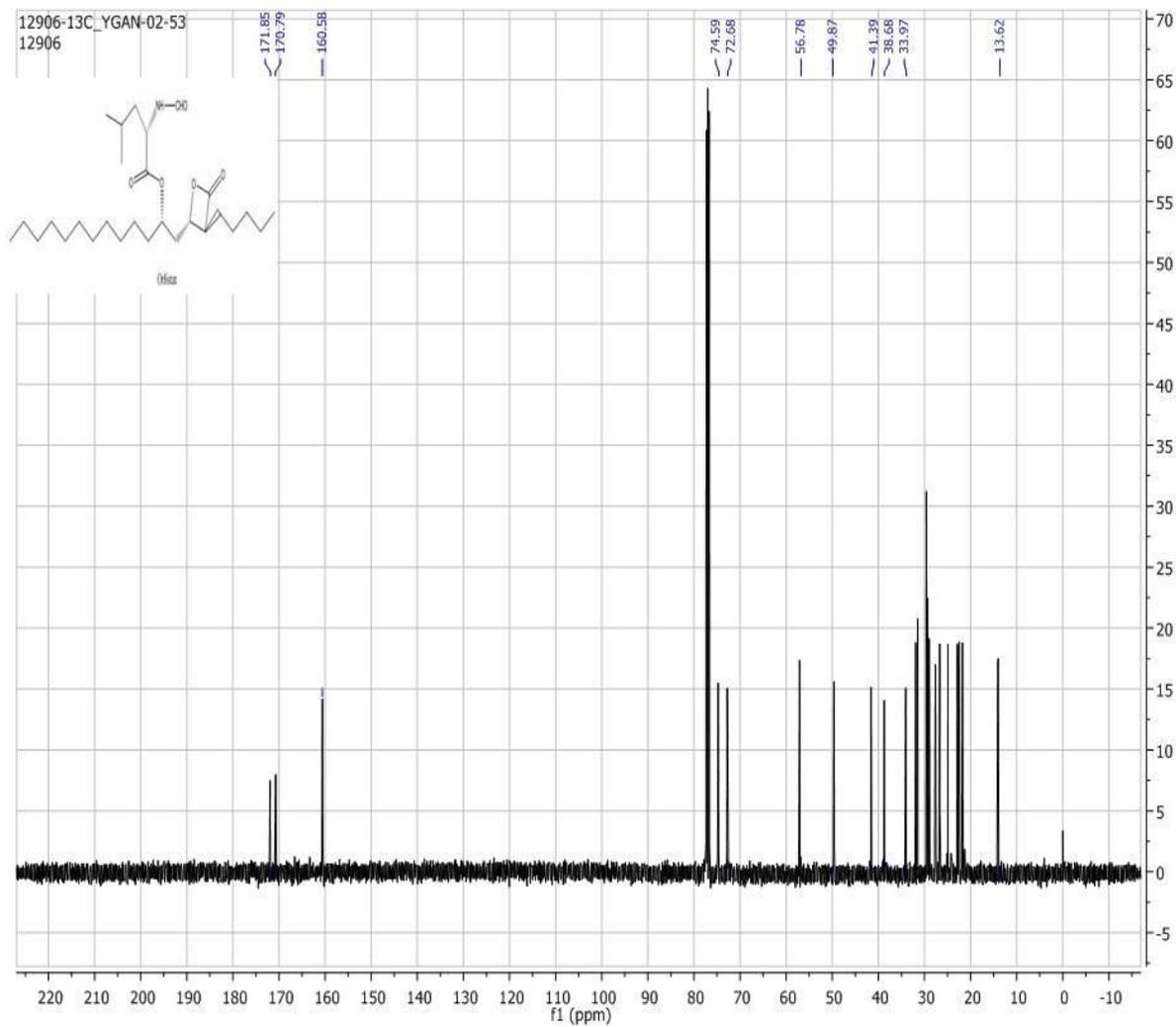
EMIE: m/z (Int. Rel.): 495(1; M<sup>+</sup>), 292(76; M<sup>+</sup>-C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>N-CO<sub>2</sub>), 114(100; M<sup>+</sup>-C<sub>22</sub>H<sub>41</sub>O<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>ON), 67(91), 95(85), 81(84), 55(42), 124(31), 293(17).

## ANEXO 2 IDENTIFICACION DEL ORLISTAT



**Figura 13.** Espectro de resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H del orlistat (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; TMS).

## ANEXO 2 IDENTIFICACION DEL ORLISTAT



**Figura 14.** Espectro de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  del orlistat (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; TMS)

# ***Hypericum silenoides* Juss. and *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht. extracts: in-vivo hypolipidaemic and weight-reducing effects in obese rats\***

Leticia García-de la Cruz<sup>a</sup>, Yareth Galvan-Goiz<sup>a</sup>, Sergio Caballero-Caballero<sup>a</sup>, Sergio Zamudio<sup>b</sup>, Alejandro Alfaro<sup>a</sup> and Andrés Navarrete<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. and <sup>b</sup>Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, Mexico

## Keywords

anti-obesity natural products; cafeteria diet; *Hypericum silenoides*; *Hypericum philonotis*; tlanchalagua

## Correspondence

Andrés Navarrete, Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Mexico D. F., Mexico.

E-mail: anavarrt@unam.mx

Received May 21, 2012

Accepted November 14, 2012

doi: 10.1111/jphp.12015

\*Taken in part of PhD work of L. García-de la Cruz.

## Abstract

**Objectives** This study was carried out to assess the anti-obesity effect of *Hypericum silenoides* Juss. and *Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht. in male Wistar rats fed with a cafeteria diet.

**Methods** Adult male Wistar rats with an initial body weight of 290–320 g were used in this trial. The rats were fed with a cafeteria diet for 77 days. *Hypericum* species were administered orally at a dose of 10, 30 or 100 mg/kg of body weight daily for 35 days. Body weight, food intake, anorexic effect and various biochemical parameters, such as serum glucose, lipid profile, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and atherogenic index (AI), were assessed. Additionally, inhibitory lipase activity assay and forced swimming test were also carried out.

**Key findings** Oral administration of *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts resulted in a significant decrease in body weight and serum glucose levels in obese male Wistar rats. Treatment with aqueous extract of *H. silenoides* showed anorexic and antidepressant effects and also significantly ( $P < 0.05$ ) decreased total cholesterol, triglycerides and high-density lipoprotein-cholesterol, while low-density lipoprotein-cholesterol, AI, AST and ALT were not changed. The dichloromethane extract of *H. silenoides* (half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) =  $262.79 \pm 0.09$   $\mu$ g/ml) and hexane extract of *H. philonotis* ( $IC_{50}$  =  $162.60 \pm 0.02$   $\mu$ g/ml) showed the most potent lipase inhibitory activity.

**Conclusion** Some *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts showed a significant anti-obesity activity in cafeteria-diet-fed rats. This research provides the first scientific support for the use of the *Hypericum* genus for weight reduction in Mexican folk medicine.

## Introduction

Recently, obesity has increased at an alarming rate and it is a worldwide health problem. It is a chronic metabolic disorder that results from the imbalance between energy intake and energy expenditure. Additionally it is characterized by increased fat mass and elevated lipid concentration in blood.<sup>[1,2]</sup> Currently, more than 1.4 billion adults worldwide are overweight and at least 500 million of them are clinically obese.<sup>[3]</sup>

Obesity is considered to be a risk factor associated with the development of major human diseases, including cardiovascular diseases, hyperlipidaemia, cancer and diabetes.<sup>[4]</sup> Western diets are high in fat and tend to promote

obesity. Increased intake of high-calorie (energy and fat) food promotes body-fat storage and greater body weight and adiposity in humans<sup>[5]</sup> and animals.<sup>[6]</sup> Cafeteria diet is a useful tool with which to study obesity in animals<sup>[7,8]</sup> and humans due to the similarity in development of obesity. In this model of obesity, the diet is self-selected, by animals, from a variety of supermarket foods that usually are high in fat and/or carbohydrates and low in proteins, vitamins and minerals.<sup>[9,10]</sup>

Despite important efforts made to develop anti-obesity drugs worldwide, only two agents—sibutramine (Reductil or Meridia, banned in some countries), an appetite

suppressant, and orlistat (Xenical), which reduces intestinal fat absorption through inhibition of lipases—have been successfully introduced into the market during recent years.<sup>[11,12]</sup> On the other hand, natural products for the treatment of obesity are actively under research, and could be an excellent alternative strategy for the development of effective and safe anti-obesity drugs.<sup>[13,14]</sup> Plant species of the genus *Hypericum* are well known for their therapeutic uses in the traditional medicine of several cultures. One of the most important and commercially recognized species of this genus is *Hypericum perforatum* L. (St John's wort) and this plant is mainly used as an antidepressant.<sup>[15,16]</sup> However, recent studies have demonstrated a significant antihyperglycaemic activity in diabetic rats treated with crude extracts of *H. perforatum*.<sup>[17,18]</sup> Another trial demonstrated that a hydroalcoholic extract of *H. perforatum* decreases body-weight gain, total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol, triglycerides, glucose and insulin in rats fed with a high-fat diet.<sup>[19]</sup> It has been also been suggested that *Hypericum* spp. could provide an alternative therapy for obese patients.<sup>[19]</sup> The Mexican flora includes some *Hypericum* spp. that could be a natural treatment for obesity. Twelve species of the genus *Hypericum* are known to be present in Mexico (*H. denticulatum*, *H. fastigiatum*, *H. formosum*, *H. galinum*, *H. hypericoides*, *H. moranense*, *H. mutilum*, *H. paniculatum*, *H. pauciflorum*, *H. philonotis*, *H. silenoides* and *H. simulans*).<sup>[20]</sup> Of these 12 species of *Hypericum*, *H. silenoides* is the most abundant and frequently used species in Mexican folk medicine for the reduction of weight.<sup>[21,22]</sup> Its popular name is 'tlanchalagua'. The common name for *H. philonotis* is 'vinagrillo' and there are no reports describing its use in traditional medicine.<sup>[20]</sup> Additionally, in Mexico several commercial products exist for the reduction of weight, which include in their composition species of the *Hypericum* genus. However, there is no scientific evidence that accounts for the anti-obesity activity of these plants. In this study we show that some *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts decreased body-weight gain, altered some serum variables and produced an anorexic effect when a novel experimental cafeteria diet was fed to rats. Additionally, both species showed an inhibitory effect on lipase activity *in vitro*.

## Materials and Methods

### Plant material

*Hypericum silenoides* Juss. was purchased at Sonora Market in Mexico City, during February 2010. A voucher specimen (No. 15542) was deposited in the Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social in Mexico City. Plant identification was confirmed by A. Aguilar.

*Hypericum philonotis* Cham. & Schlecht. was collected from Pátzcuaro, Michoacán de Ocampo, Mexico, during

September 2010. Plant identification was carried out by a botanist at the Herbarium IEB of the Institute of Ecology, A. C., Mexico (IE-Bajío) where a voucher specimen was deposited (No. 14864).

### Preparation of *Hypericum* extracts

#### Organic extracts

Five kilograms of the aerial parts of *H. silenoides* were dried at room temperature (~22°C) under shadow. After grinding, they were consecutively extracted by maceration at room temperature three times for three consecutive days, each time with 20 l of the following solvents: hexane, dichloromethane and methanol. After evaporation of the solvents under vacuum (Büchi B-480, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), 124.8 g of hexane extract, 74.8 g of dichloromethane extract and 678.1 g of methanol extract were obtained. The same procedure was applied to 3 kg of the aerial parts of *H. philonotis* and 70.7 g of hexane extract, 58.3 g of dichloromethane extract and 283.0 g of methanol extract were obtained. All extracts were kept in an airtight and waterproof containers and stored at 4°C until their use.

#### Aqueous extract

Five hundred g of dried *H. silenoides* was cut into small pieces and simmered for 30 min in a conical flask containing 2 l of distilled water. The decoction was allowed to cool at room temperature for approximately 1 h and then was filtered through a piece of clean white cotton pad. The filtrate was evaporated to complete dryness in a vacuum (Büchi V 850, Büchi Labortechnik AG) at 50 °C and 72 mbar. The semisolid residue (11.3 g) was kept in an airtight and waterproof container and stored at 4°C until its use. The same procedure was applied to 500 g of *H. philonotis* and 17.4 g of aqueous extract was obtained.

### HPLC analysis

The composition of aqueous extract from *H. silenoides* was analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to Pharmacopeial Method (USP 30).<sup>[27]</sup> Briefly, the HPLC system consisted of a 600 Waters Delta pump (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a Waters 600E automated gradient controller and a Waters 717 Plus automatic sample injection module. The detection was performed with a photodiode array detector (PDAD) Waters 2996 working in the range of 200–400 nm. The chromatograms were recorded and processed by Waters Empower 5.0 software. The concentration of the aqueous extract of *H. silenoides* extract was 1 mg/ml (methanol–water, 9 : 1, v/v).

Analyses were carried out at 30°C with a Symmetry C<sub>18</sub> column (4.6 × 250 mm internal diameter, 5 µm; Waters,

**Table 1** Linear gradient programme for HPLC analysis

Time (min)	Solvent A (%) <sup>a</sup>	Solvent B (%) <sup>b</sup>	Solvent C (%) <sup>c</sup>
Initial	100	0	0
10	85	15	0
30	70	20	10
40	10	75	15
55	5	80	15
56	100	0	0
65	100	0	0

<sup>a</sup>Solvent A, 0.3% phosphoric acid; <sup>b</sup>Solvent B, acetonitrile; <sup>c</sup>Solvent C, methanol.

Dublin, Ireland). Mobile phase (A = 0.3% phosphoric acid; B = acetonitrile; C = methanol) was used in a linear gradient programme shown in Table 1. The flow-rate was 1.0 ml/min and the injection volume was 10 µl. Peaks were detected at 270 nm.<sup>[27]</sup>

### Identification of the components in *H. silenoides*

The identification of the compounds found by HPLC was based on the comparison of their retention time ( $t_R$ ) with those obtained for the authentic reference samples.<sup>[27]</sup>

### Drugs

Sibutramine hydrochloride (pharmaceutical grade) was from Helm de Mexico S.A. de C.V. (Naucalpan, Mexico). Type II porcine pancreatic lipase and *p*-nitrophenylpalmitate were from Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA). Tris (hydroxymethyl)aminometane was from USBiological (Swampscott, MA, USA). Orlistat was isolated and purified from Xenical (Roche, Toluca, Mexico). Hyperforin, hypericin and pseudohypericin were purchased from CromaDex-kit-00019545-005 (CromaDex, Irvine, CA, USA). Quercetin was from Fluka Chemicals (Sigma-Aldrich Division, Milan, Italy). Rutin was from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Chorogenic acid was from Extrasynthèse (Genay, France). Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were from J. T. Baker (Deventer, Netherlands). Phosphoric acid (85%, reagent grade) was from Ashland (Milan, Italy). Water was purified by a Milli-Q<sub>plus</sub> system (Millipore, Milford, MA, USA). The other reagents used were of analytical grade. All drugs were prepared immediately before experimentation.

### Experimental animals and diets

Ninety male adult Wistar rats with initial body weight between 290 and 320 g were obtained from Centro UNAM Harlan (Mexico City, Mexico). They were housed in groups of six in plastic cages in a temperature-controlled room at

22 ± 2°C under a 12-h light–dark cycle (lights on at 06:00 h). The rats were given free access to tap water and laboratory food (Teklad Global Rodent Diets, Harlan).

Two weeks later, the rats were randomly divided into two dietary groups, and allowed free access for 77 days to either a cafeteria diet (CF group; *n* = 84, six rats/cage) or a standard diet (S group; *n* = 6).<sup>[9,10]</sup> Food intake and body weight were recorded each week. All rats had access to drinking water or sucrose (25%).

Experiments were conducted according to the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and compliance with international rules on care and use of laboratory animals. Clearance for conducting the studies was obtained from the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, 'Facultad de Química, UNAM' (OFICIO/FQ/CICUAL/020/11) approval date 16 May 2011.

The control diet consisted of tap water and standard rat diet pellets (Teklad Global Rodent Diets, Harlan). The experimental cafeteria diet was a modification of a cafeteria diet described by Prats *et al.*:<sup>[10]</sup> standard rat diet pellet, bacon (Kir), salted peanuts (Mafer Premium), potato chips (Sabritas), cookies (Chokis, Gamesa), manchego-type cheese (Alpura), chocolate bars (Nestlé), sweet bread, Mexican bread roll (white wheat flour), tortillas (cooked maize dough), carrots and sucrose at 25%. All these foods were prepared in small pieces and presented inside the rat cages daily.

### Measure of food consumption

The rats were periodically introduced into single metabolic cages for the measurement of their food intake (cafeteria or standard diet).<sup>[9]</sup> In this case 10 g of each components of the cafeteria diet (total weight 110 g) were mixed and offered in small pieces to allow the recovery the following day of at least part of all components provided. Water or sucrose (25%) consumption was measured by determining the weight of the remaining fluid contained in the drink bottles at the time of location change. The S group received 110 g of standard rat diet pellets.

The amount of each component consumed by each rat was calculated from the difference between the amount provided and the amount recovered the next day.<sup>[9,10]</sup> The energy content of each food was calculated by using the energy correlates of lipid (9 Kcal/g), protein (4 Kcal/g) and carbohydrate (4 Kcal/g).<sup>[23]</sup> The results from this study are shown in Table 2.

### Administration of treatments

On day 77, body weights (476 ± 22 g) of the CF group were 24.6% higher than body weights (382 ± 19 g) of the S

**Table 2** Energy content and composition of ingredients that constitute the cafeteria diet

Food	Energy (kcal/100 g)	Protein (g/100 g)	Carbohydrate (g/100 g)	Lipid (g/100 g)
Bacon	655	4.1	0	71
Salted peanuts	572	24	20	44
Potato chips	528	4	56	32
Cookies	504	5.6	68	21.3
Manchego-type cheese	485	5.3	4.4	40.3
Chocolate	451	3.2	78	14
Sweet bread	445	7.9	48.3	24.5
Mexican bread roll (white wheat flour)	309	9.2	65.2	0.4
Tortillas (cooked maize dough)	224	5.8	49.5	1.1
Carrots	51	0.3	12.3	0.3
Standar chow pellets	320	23.9	50.8	4.4
Sugar	384	0	99.1	0
Total	4928	93.3	551.6	253.3

All data refer to the weight of the fresh materials. Nutrition values were taken from food label.

**Table 3** Random assignment of rats to different groups

Group No.	Treatment	Dose (mg/kg/day)	n for each group
Group 1	Standard diet + Tween 80	–	6
Group 2	Cafeteria diet + Tween 80	–	6
Group 3	Cafeteria diet + sibutramine	5 and 10	3
Cafeteria diet + <i>Hypericum silenoides</i>			
Group 4–6	Hexane extract	10, 30 and 100	3
Group 7–9	Dichloromethane extract	10, 30 and 100	3
Group 10–12	Methanol extract	10, 30 and 100	3
Group 13–15	Aqueous extract	10, 30 and 100	3
Cafeteria diet + <i>Hypericum philonotis</i>			
Group 16–18	Hexane extract	10, 30 and 100	3
Group 19–21	Dichloromethane extract	10, 30 and 100	3
Group 22–24	Methanol extract	10, 30 and 100	3
Group 25–27	Aqueous extract	10, 30 and 100	3

group. On day 77, *Hypericum* crude extracts were suspended in 0.5% Tween 80 and administered orally through a gastric cannula at 10, 30 or 100 mg/kg per day for 35 days. The drugs/extracts were administered daily at 1700 h (1 h before the start of the dark period). The doses of extract were selected on the basis of pilot tests performed in our laboratory. Sibutramine was used as reference drug and dissolved in physiological saline (0.9%). The dose range (5 and 10 mg/kg) was determined from the existing literature.<sup>[24]</sup> A cafeteria diet and a standard diet control group were included.

The rats were randomly allocated to groups (Table 3). The number of rats in each group was determined based on a 3-factor design (treatments, doses and plants), which allowed for statistically valid comparison. Additionally, the number of rats in each group was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, 'Facultad de Química, UNAM' (OFICIO/FQ/CICUAL/020/11).

### Effect of *Hypericum* extracts on body weight and food intake

Treatments (drugs/extracts) were begun on day 77 and administered daily for 35 days. The CF control group and the S control group received the same volume of vehicle (0.5% Tween 80). Body weight was recorded each week. All groups continued on the same dietary regimen (cafeteria or standard diet). At the end of the treatments, the rats were introduced into single metabolic cages for the measurement of their food intake. The procedure was described in the measure of food consumption section.

### Blood glucose and lipid profile determination

After 35 days on treatments and 12 h of fasting, rats were anaesthetized by ether inhalation and 5 ml of blood was collected from the femoral vein. Blood samples were centrifuged at 2400 rpm for 15 min and serum was separated.

Glucose, total serum cholesterol (total-C), triglycerides, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and atherogenic index (AI) were analysed by the University Clinical Laboratory of School of Pharmacy (FES Zaragoza UNAM), using a Reflotron Plus apparatus (Roche, LABSSA, Mexico City, Mexico).

### Forced swimming test

This test was performed according to the method described by Sánchez-Mateo *et al.*<sup>[25]</sup> with slight modifications. After 35 days on treatments (drugs, extracts or vehicles) and 1 h after oral administration, rats were individually forced to swim in a plastic cylinder (42 cm high, 33 cm in diameter) filled with 35 cm of water at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . The total duration of immobility (s) was measured during the last 4 min of a single 6-min test session. Rats were considered immobile when they made no further attempts to escape except the movements necessary to keep their heads above the water.<sup>[25]</sup> The number of rats in each group was determined based on a 3-factor design (treatments, doses and plants), which allowed for statistically valid comparison.

### Pancreatic lipase activity assay

The procedure described by Lee *et al.*<sup>[26]</sup> to test lipase inhibition activity was used. Briefly, the following solutions were mixed in a microplate (added in order): 10  $\mu\text{l}$  of *p*-nitrophenylpalmitate (5.6 mg dissolved in 1.6 ml acetonitrile and adjusted to 5 ml with ethanol to reach a final concentration of 3 mM), 162  $\mu\text{l}$  of 75 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 16  $\mu\text{l}$  of test solution and 12  $\mu\text{l}$  of type II porcine pancreatic lipase (5 mg/ml in 75 mM Tris-HCl buffer). This mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 25 min and then the absorbance was determined at 405 nm (BIO-RAD microplate reader model 680, Philadelphia, PA, USA). In the positive control, the extracts were replaced with the vehicle (dimethyl sulfoxide or water). A blank used the same mixture but without the substrate. Orlistat was used as a positive lipase inhibitor and was dissolved in ethanol, which alone served as vehicle control. The dose range 0.024, 0.08, 0.24, 0.8 and 2.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was determined from the literature.<sup>[26]</sup> The final concentrations of each extract evaluated were 3, 30, 100, 300 and 562  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### Statistical analyses

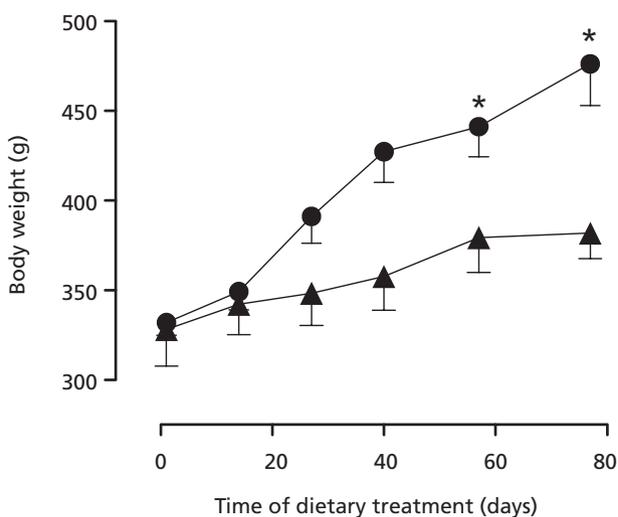
All values are reported as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Two-way analysis of variance followed by the Bonferroni test was used to determine the significance ( $P < 0.05$ ). GraphPad Prism (version 5.0 for Mac OS X, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) software was used for statistical analysis.

## Results

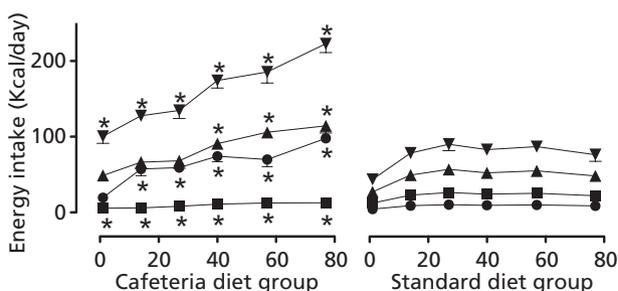
### Effect on body weight and food intake

On day 77, the body weights ( $476 \pm 22$  g) of the rats in the CF group were 24.6% higher than the body weights ( $382 \pm 19$  g) of the S group (Figure 1). The cafeteria diet consumed by the rats was hypercaloric, hyperlipidic, hyperglycaemic and lower in proteins. Figure 2 shows the total energy intake (kcal per day) and the energy intake from lipid, carbohydrate and protein consumed by feeding on a cafeteria diet or standard diet.

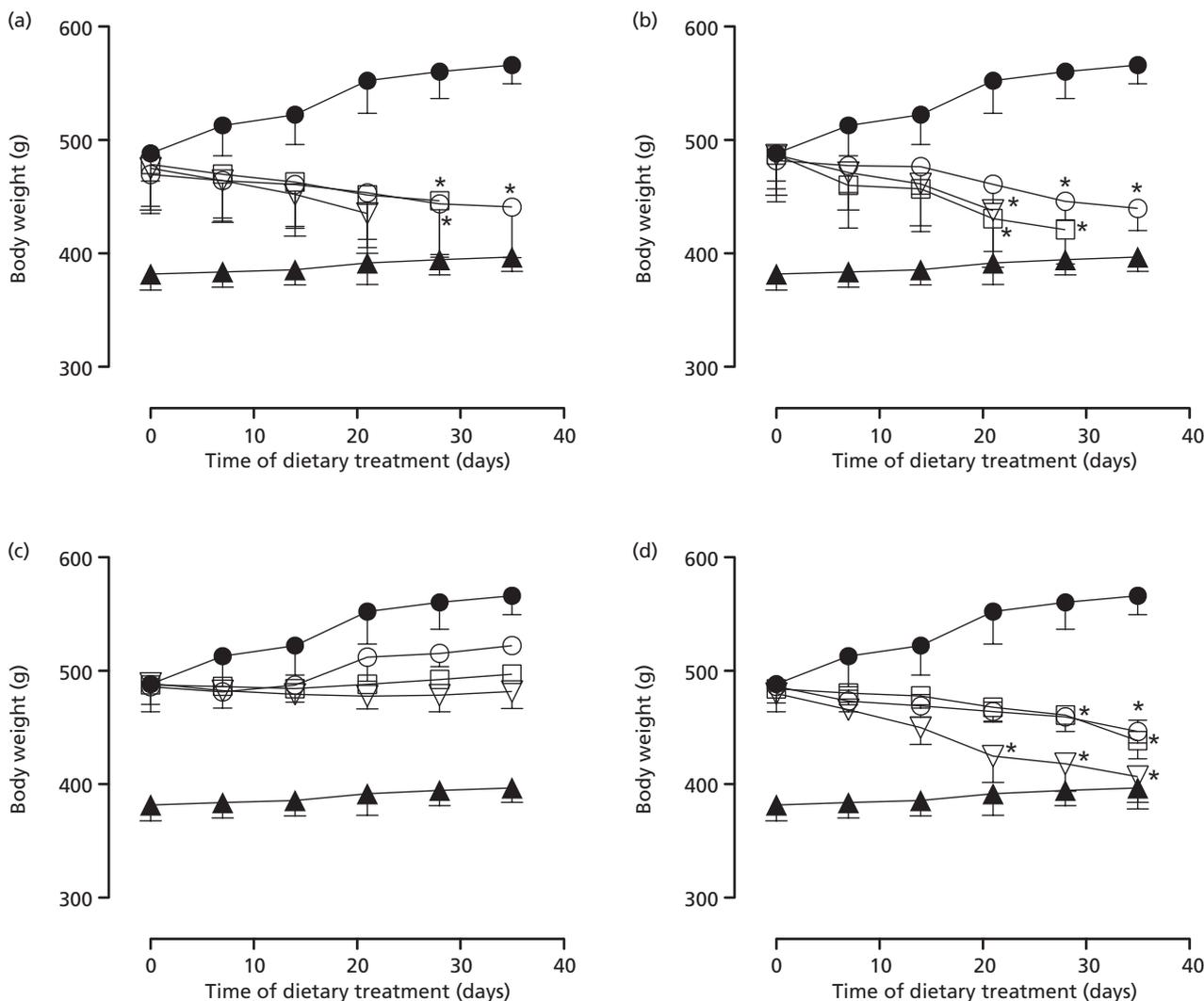
The crude extracts of *H. silenoides* significantly reduced the body-weight gain induced by cafeteria diet (Figure 3). On day 35 of treatment, hexane (10 mg/kg), dichloromethane (10 mg/kg) and aqueous (10, 30 and 100 mg/kg) extracts of *H. silenoides* reduced body-weight gain with



**Figure 1** Body weight increase during cafeteria diet feeding in rats. Standard diet group (▲) and cafeteria diet group (●). Values are mean  $\pm$  SEM for six rats. \* $P < 0.05$  compared with standard diet group.



**Figure 2** Total energy intake (▼), carbohydrate (▲), lipid (●) and protein (■) contribution throughout the feeding on a cafeteria diet. Values are mean  $\pm$  SEM for six rats. \* $P < 0.05$  compared with standard diet group.



**Figure 3** Effect of (a) hexane, (b) dichloromethane, (c) methanol and (d) aqueous extracts of *Hypericum silenoides* on body-weight change in cafeteria diet overweight rats. Cafeteria diet control group (●), 10 mg/kg extract (○), 30 mg/kg extract (□), 100 mg/kg extract (▽) and standard diet control group (▲). Values are mean ± SEM for three rats in each group. \*P < 0.05 compared with cafeteria-diet-fed rats.

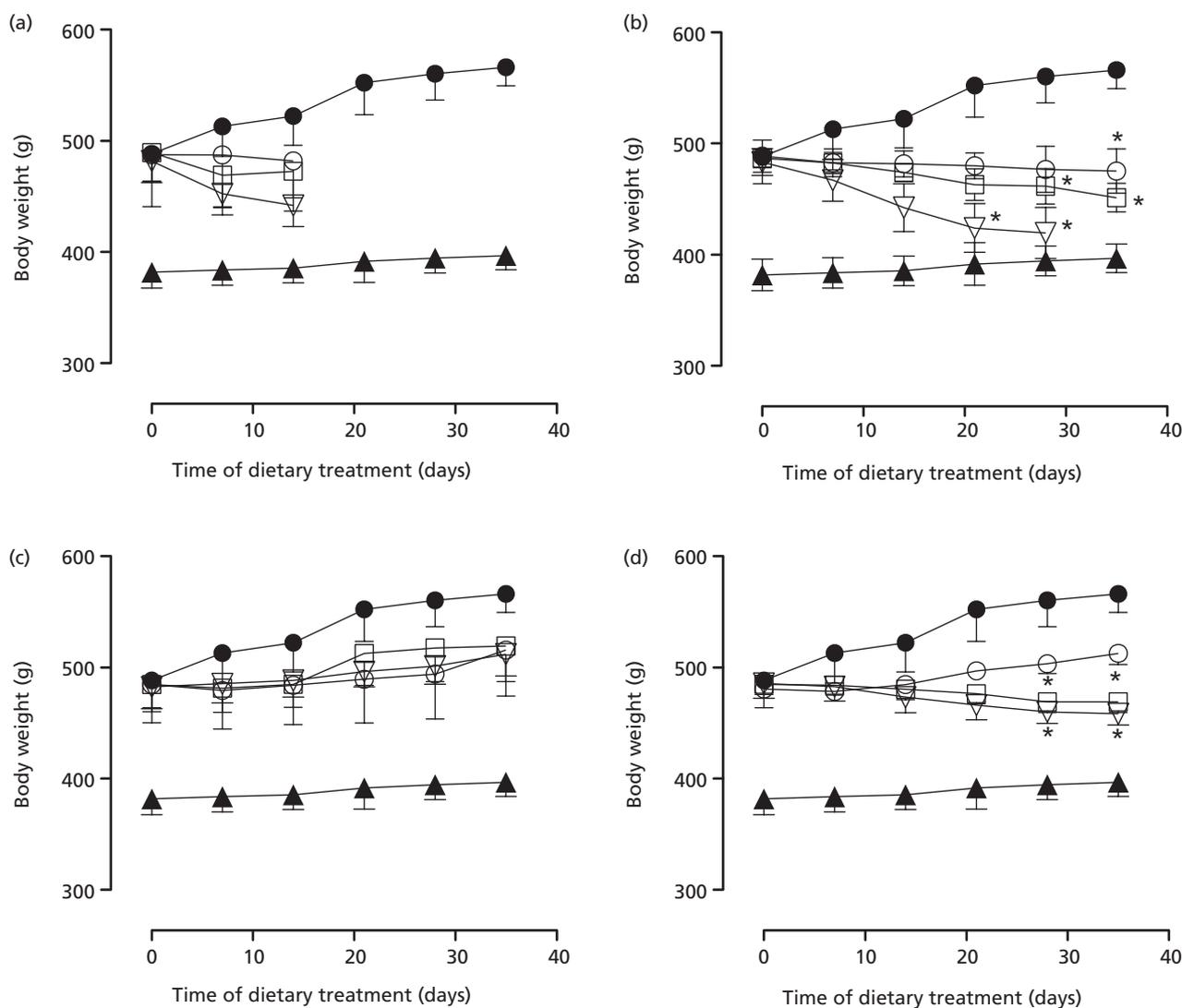
respect to the CF group ( $P < 0.05$ ). In contrast, the methanol extract had no effect (Figure 3c). The order of the extracts' efficacy on maximum percentage of reduction of body-weight gain was: aqueous ( $15.4 \pm 5.2\%$ ) > dichloromethane ( $8.7 \pm 1.5\%$ ) > hexane ( $6.4 \pm 3.0\%$ ) > methanol (no effect). Additionally, hexane (30 and 100 mg/kg) and dichloromethane (30 and 100 mg/kg) extracts of *H. silenoides* induced diarrhoea and premature death of the rats. In this matter, we detected some symptoms such as steatorrhoea, abdominal bloating and swelling. In both cases, we observed petechiae in abdominal muscle and an increase in heart size.

The oral administration of dichloromethane (10 and 30 mg/kg) and aqueous (30 and 100 mg/kg) extracts of *H. philonotis* (Figure 4) resulted in statically significant

reduction in body weight ( $P < 0.05$ ), but the methanol extract did not show significant effects. The hexane extract of *H. philonotis* also induced toxic effects and the death of the rats on day 15 of its oral administration (symptoms included steatorrhoea, abdominal bloating, swelling and petechiae in abdominal muscle).

The order of the extracts' efficacy on maximum percentage of reduction of body-weight gain produced by *H. philonotis* was: dichloromethane ( $7.3 \pm 2.5\%$ ) > aqueous ( $5.6 \pm 1.0\%$ ) > methanol (no effect). Sibutramine at 5 and 10 mg/kg reduced body-weight gain by  $17.0 \pm 12.3\%$  and  $18.0 \pm 9.9\%$ , respectively (Figure 5).

The aqueous extract of *H. silenoides* showed the greatest effect in reducing food intake (by 51.1%) followed by dichloromethane (36.0%) and hexane (34.8%)



**Figure 4** Effect of (a) hexane, (b) dichloromethane, (c) methanol and (d) aqueous extracts of *Hypericum philonotis* on body weight-change in cafeteria diet overweight rats. Cafeteria diet control group (●), 10 mg/kg extract (○), 30 mg/kg extract (□), 100 mg/kg extract (▽) and standard diet control group (▲). Values are mean  $\pm$  SEM for three rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with cafeteria-diet-fed rats.

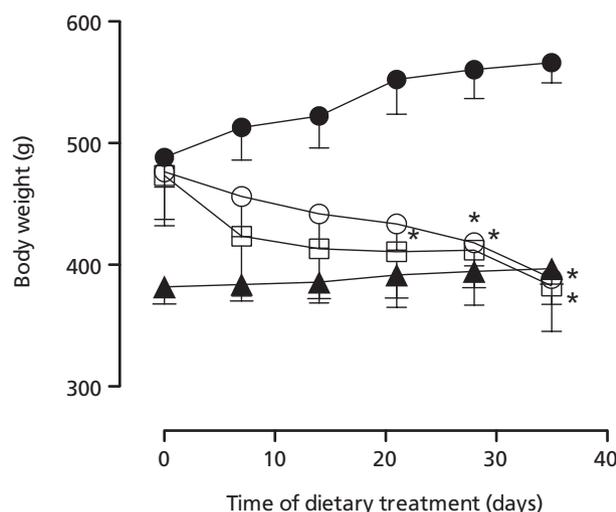
extracts (Table 4). With respect to *H. philonotis* only the dichloromethane extract reduced the food intake (by 36.4%) (Table 4).

### Blood glucose and lipid profile

Cafeteria diet induced significant increase of plasma total cholesterol, triglycerides and HDL-C compared with standard diet control group of rats (Tables 5, 6). AI, AST and ALT were decreased by cafeteria diet treatment, while LDL-C and glucose did not change (Tables 5, 6). Rats treated with *H. silenooides* (Table 5) crude extracts showed an important decrease in glucose levels (52.0–75.5%) and this decrease was dose dependent. The best hypoglycaemic

activity was presented by the aqueous extract at 100 mg/kg. Additionally, this extract decreased ( $P < 0.05$ ) total cholesterol, triglycerides and HDL-C while LDL-C, AI, AST and ALT were not significantly altered ( $P > 0.05$ ) (Table 5).

Crude extracts of *H. philonotis* (Table 6) significantly reduced blood glucose levels (between 48% and 58%). Methanol and dichloromethane extracts of this plant caused a significant decrease in AST levels and increased total cholesterol, HDL-C and LDL-C levels (Table 6). The aqueous extract decreased triglyceride levels ( $P < 0.05$ ). Rats treated with sibutramine showed a significant decrease in plasma glucose, but increased total cholesterol, HDL-C and LDL-C levels (Tables 5, 6).



**Figure 5** Effect of 5 mg/kg (○) or 10 mg/kg (□) of sibutramine on body-weight change in cafeteria diet overweight rats. Cafeteria diet control group (●) and standard diet control group (▲). Values are mean  $\pm$  SEM for three rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with cafeteria-diet-fed rats.

### Forced swimming test

In the forced swimming test, the cafeteria diet induced significant increase in the duration of immobility time compared with the standard diet control group of rats (Table 7). Only hexane (10 mg/kg) and aqueous (30 and 100 mg/kg) extracts of *H. silenoides* decreased the duration of immobility time in comparison with the cafeteria diet control ( $P < 0.05$ ). In contrast *H. philonotis* extracts did not show an effect (Table 7). Sibutramine at 5 and 10 mg/kg reduced the duration of immobility time ( $63.8 \pm 32.3$  s and  $2.0 \pm 2.0$  s, respectively) (Table 7).

### Effect on pancreatic lipase activity

*Hypericum silenoides* and *H. philonotis* showed an inhibitory effect on lipase activity *in vitro* (Figure 6). The hexane extract of *H. philonotis* was the most active extract in inhibiting pancreatic porcine lipase *in vitro* (half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )  $162.60 \pm 0.02$   $\mu$ g/ml), followed by dichloromethane ( $IC_{50}$   $197.24 \pm 0.11$   $\mu$ g/ml) and aqueous ( $IC_{50}$   $341.45 \pm 0.07$   $\mu$ g/ml) extracts of this plant (Table 8). Only the dichloromethane ( $IC_{50}$   $262.79 \pm 0.09$   $\mu$ g/ml) and aqueous ( $IC_{50}$   $403.70 \pm 0.08$   $\mu$ g/ml) extracts of *H. silenoides* showed inhibitory lipase activity (Table 8). Orlistat, used as reference inhibitor lipase drug, presented an  $IC_{50}$  value of  $0.041 \pm 0.0028$   $\mu$ g/ml (Table 8).

### Constituents of *H. silenoides*

HPLC analyses were performed to identify the constituents of aqueous extract of *H. silenoides*; a typical chromatogram

is reported in Figure 7. The  $t_R$  values for chlorogenic acid (peak 1), rutin (peak 2), quercetin (peak 3) and hyperforin (peak 4) were 19.42, 26.31, 40.71 and 49.71 min, respectively. *H. silenoides* did not contain hypericin and pseudohypericin.

### Discussion

The experimental cafeteria diet used in this study was an adequate diet to make the rats overweight (Figure 1). The body-weight gain reached with this diet was in agreement with the weight gain reported for similar cafeteria diets in rats in other studies.<sup>[9,10,28,29]</sup> It has been reported that palatable human foods included in cafeteria diets stimulate energy intake<sup>[10,28]</sup> and induce hyperphagia, which results in an increase of heat production,<sup>[29]</sup> as well as increase fat stores in rats.<sup>[30]</sup> After standardization of the overweight rat model, we started the evaluation of plant extracts on overweight rats. Daily oral administration of *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts for 35 consecutive days clearly reduced body-weight gain and induced hypoglycaemic and hypolipidaemic effects in rats (Figures 3, 4). Methanol extracts of both plants were the exception. Recent studies have demonstrated that hydroalcoholic extract of *H. perforatum* decreases body-weight gain, total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, glucose and insulin in rats fed a high-fat diet.<sup>[19]</sup> These results were attributed to increased serotonin levels due to *H. perforatum* inhibiting synaptosomal uptake of this neurotransmitter.<sup>[19]</sup> It is a well-known fact that, there is an inverse relationship between the level of brain serotonin signalling and food intake—when brain serotonin signalling is augmented, food intake is reduced, and vice versa.<sup>[31]</sup> Therefore, manipulation of endogenous serotonin synthesis, bioavailability and metabolism provides important evidence for the role of endogenous serotonin in the regulation of food intake and body weight.<sup>[31]</sup> It is possible that active extracts of *H. silenoides* and *H. philonotis*, like *H. perforatum* extract, can increase brain serotonin, resulting in reduced food intake and finally promoting weight loss. Additionally, the swimming test in the current study demonstrated that oral administration of hexane and aqueous extracts from *H. silenoides* produced a reduction of immobility time when compared with the CF group. This suggested that *H. silenoides* produced a possible antidepressant effect in obese rats. The forced swimming test is a widely accepted pharmacological tool for the evaluation of antidepressant activity.<sup>[25]</sup> In this assay, rats are forced to swim in a restricted space from which there is no escape, and will, after periods of agitation, cease attempts to escape and become immobile. The characteristic behaviour scored in this test is termed as immobility, reflecting behaviour despair as seen in human depression and it is well known that antidepressant drugs are able to reduce the

**Table 4** Anorexic effect of *Hypericum silenoides* and *Hypericum philonotis*

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Average food intake (g)	Food intake (%)
Standard diet + Tween 80	–	21.6 ± 1.0	
Cafeteria diet + Tween 80	–	45.7 ± 4.1*	111.8 ± 19.1*
Cafeteria diet + sibutramine	5	36.2 ± 0.7	–21.0 ± 1.4
	10	27.3 ± 3.5†	–40.3 ± 7.7†
<i>Cafeteria diet + Hypericum silenoides</i>			
Hexane extract	10	29.8 ± 6.1†	–34.8 ± 13.4†
	30	+	+
	100	+	+
Dichloromethane extract	10	29.3 ± 1.2†	–36.0 ± 2.7†
	30	+	+
	100	+	+
Methanol extract	10	40.5 ± 5.3	–11.5 ± 11.5
	30	39.8 ± 3.6	–12.9 ± 7.8
	100	39.1 ± 5.3	–14.5 ± 11.5
Aqueous extract	10	32.0 ± 3.8	–29.9 ± 8.4
	30	30.1 ± 4.3†	–34.1 ± 9.5†
	100	22.3 ± 1.2†	–51.1 ± 2.6†
<i>Cafeteria diet + Hypericum philonotis</i>			
Hexane extract	10	+	+
	30	+	+
	100	+	+
Dichloromethane extract	10	42.2 ± 2.5	–7.6 ± 5.4
	30	29.1 ± 5.7†	–36.4 ± 12.5†
	100	+	+
Methanol extract	10	41.1 ± 4.0	–10.0 ± 8.7
	30	41.4 ± 1.9	–9.4 ± 4.1
	100	44.9 ± 1.1	–1.9 ± 2.3
Aqueous extract	10	44.9 ± 4.5	–1.8 ± 9.9
	30	41.2 ± 3.8	–9.9 ± 8.2
	100	41.7 ± 9.4	–8.8 ± 16.7

Data are means ± SEM,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs standard diet group; † $P < 0.05$  vs cafeteria diet group; + = death before end the experiments.

immobility time in rats.<sup>[25]</sup> Hyperforin has been identified as one of the main components of *H. perforatum* responsible for its antidepressant effects.<sup>[32–35]</sup> This compound inhibits the reuptake of serotonin, dopamine and noradrenaline.<sup>[32–35]</sup> Hyperforin, rutin, chlorogenic acid and quercetin were identified in the aqueous extract from *H. silenoides*. It is possible that hyperforin present in this extract is able to increase serotonin levels and as a consequence this may explain the reduce food intake in our rat model and the final promotion of weight loss.

On the other hand antidiabetic<sup>[17]</sup> and antihyperglycaemic activity<sup>[18]</sup> have been observed in a standardized *H. perforatum* extract. Hyperforin has been considered to be one of the antihyperglycaemic bioactive components of *H. perforatum*. This compound is a potent releaser of diverse types of neurotransmitters.<sup>[32–35]</sup> Hyperforin has also been reported to activate cation channels of the transient receptor potential currents (TRPC6) changing intracellular sodium and calcium concentration.<sup>[36]</sup> Acetylcholine is released from the intrapancreatic parasympathetic nerve endings during food intake. It potentiates insulin secretion

through stimulation of muscarinic G protein-coupled receptors (M3) on the pancreatic beta cell. M3 stimulation by acetylcholine can activate TRP-like channels in neurons and beta cells.<sup>[37,38]</sup> Activation of TRP-like channels by muscarinic stimulation may contribute to beta cell depolarization and play a role in the insulin-potentiating effects of acetylcholine during feeding.<sup>[39]</sup> Hence it is possible that hyperforin present in the aqueous extract from *H. silenoides* can activate TRPC6 channels and as a result increase insulin release, resulting in an antihyperglycaemic activity.<sup>[38,39]</sup>

The hypolipidaemic mechanism(s) for these two *Hypericum* species is not known, but could involve blockade of biosynthesis of cholesterol or decrease intestinal absorption.<sup>[40]</sup> However, it is necessary to carry out additional experiments to clarify this effect.

Additionally, one of the most promising strategies in the effort to reduce energy intake, without altering the central mechanisms, is the development of inhibitors of intestinal absorption of nutrients.<sup>[41]</sup> Pancreatic lipase inhibition is one of the studied mechanisms for natural products as

**Table 5** Plasma composition of rats treated with *Hypericum silenoides*

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	LDL-cholesterol (mg/dl)	AI	AST (IU/l)	ALT (IU/l)
Standard diet + Tween 80	-	109.0 ± 10.0	42.3 ± 4.4	77.2 ± 7.6	28.7 ± 2.8	4.3 ± 1.0	1.48 ± 0.03	305.0 ± 64.0	133.0 ± 22.0
Cafeteria diet + Tween 80	-	133.3 ± 11.3	76.8 ± 6.3*	99.4 ± 6.6*	56.5 ± 5.0*	5.8 ± 0.7	1.35 ± 0.02*	179.4 ± 9.5*	69.1 ± 9.7*
Cafeteria diet + sicutramine	5	139.0 ± 15.5	110.0 ± 9.1*	87.3 ± 4.8	76.0 ± 6.1	12.7 ± 2.3*	1.43 ± 0.03	311.3 ± 22.7	132.3 ± 35.3
	10	26.0 ± 8.4*	88.7 ± 16.3	84.7 ± 21.2	67.7 ± 12.5	12.3 ± 1.3*	1.30 ± 0.06	76.7 ± 36.3	78.3 ± 3.8
Hexane extract	10	52.0 ± 2.9*	55.3 ± 5.8	80.0 ± 7.2	51.0 ± 7.8	6.0 ± 1.2	1.13 ± 0.18*	240.7 ± 21.9	74.0 ± 11.6*
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Dichloromethane extract	10	62.3 ± 4.5*	77.0 ± 5.3	110.7 ± 15.1	58.7 ± 3.8	10.3 ± 1.2*	1.33 ± 0.03	111.3 ± 21.0	52.3 ± 1.3
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol extract	10	37.0 ± 25.2†	118.0 ± 13.4 <sup>b</sup>	100.7 ± 13.4	84.0 ± 13.4	20.0 ± 3.0†	1.43 ± 0.09	14.0 ± 6.0 <sup>b</sup>	100.3 ± 9.0
	30	42.0 ± 14.3†	102.0 ± 21.3	73.3 ± 8.0	79.3 ± 15.8	15.0 ± 2.4 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.00	52.3 ± 39.3 <sup>b</sup>	70.0 ± 16.0
	100	96.3 ± 10.7	94.3 ± 4.7	102.3 ± 17.0	71.3 ± 2.7	11.0 ± 3.0	1.30 ± 0.00	172.0 ± 78.3	67.7 ± 15.0
Aqueous extract	10	64.0 ± 9.3†	47.0 ± 1.1†	61.3 ± 8.7†	37.3 ± 0.7†	4.3 ± 0.3	1.27 ± 0.03	197.0 ± 26.0	49.0 ± 5.5
	30	55.3 ± 15.3†	86.7 ± 3.3	89.3 ± 21.3	64.0 ± 7.0	9.3 ± 0.7	1.40 ± 0.10	109.3 ± 6.0	160.0 ± 81.0
	100	32.7 ± 19.7†	57.3 ± 2.2	70.0 ± 4.7	43.0 ± 3.5	8.3 ± 1.5	1.37 ± 0.07	57.3 ± 45.0	69.0 ± 8.6

AI, atherogenic index; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Data are means ± SEM, n = 3. \*P < 0.05 vs standard diet group; †P < 0.05 vs cafeteria diet group; + = death.

**Table 6** Plasma composition of rats treated with *Hypericum philonotis*

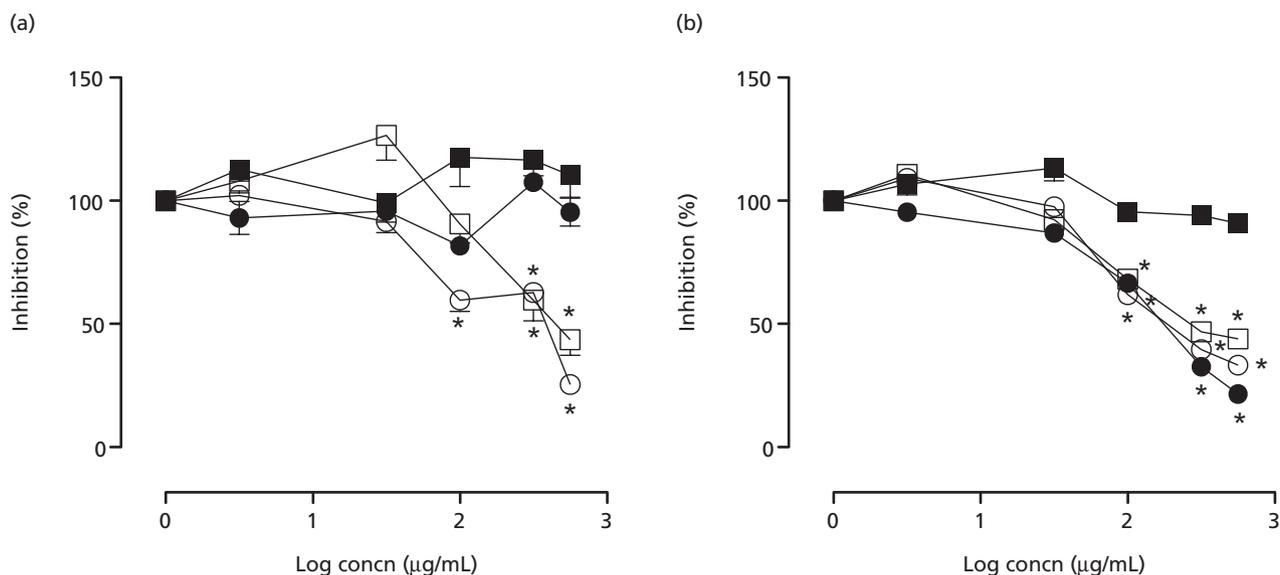
Treatment	Dose (mg/kg/day)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	HDL-cholesterol (mg/dl)	LDL-cholesterol (mg/dl)	AI	AST (IU/l)	ALT (IU/l)
Standard diet + Tween 80	-	109.0 ± 10.0	42.3 ± 4.4	77.2 ± 7.6	28.7 ± 2.8	4.3 ± 1.0	1.48 ± 0.03	305.0 ± 64.0	133.0 ± 22.0
Cafeteria diet + Tween 80	-	133.3 ± 11.3	76.8 ± 6.3*	99.4 ± 6.6*	56.5 ± 5.0*	5.8 ± 0.7	1.35 ± 0.02*	179.4 ± 9.5*	69.1 ± 9.7*
Cafeteria diet + sicutramine	5	139.0 ± 15.5	110.0 ± 9.1*	87.3 ± 4.8	76.0 ± 6.1	12.7 ± 2.3*	1.43 ± 0.03	311.3 ± 22.7	132.3 ± 35.3
	10	26.0 ± 8.4*	88.7 ± 16.3	84.7 ± 21.2	67.7 ± 12.5	12.3 ± 1.3*	1.30 ± 0.06	76.7 ± 36.3	78.3 ± 3.8
Hexane extract	10	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Dichloromethane extract	10	96.3 ± 24.4	84.0 ± 10.4	104.0 ± 23.6	59.3 ± 6.6	11.3 ± 4.4	1.45 ± 0.04	49.7 ± 16.4	173.0 ± 79.0
	30	58.3 ± 3.2†	96.0 ± 14.5	89.0 ± 2.7	72.3 ± 11.2	9.8 ± 2.3	1.27 ± 0.03	34.6 ± 20.3 <sup>b</sup>	110.3 ± 7.0
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanol extract	10	64.7 ± 3.2†	105.0 ± 13.0	88.7 ± 14.7	78.3 ± 5.0†	13.0 ± 2.7†	1.43 ± 0.07	30.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	103.3 ± 13.4
	30	69.0 ± 16.0†	78.3 ± 0.9	82.0 ± 12.1	58.0 ± 1.0	9.7 ± 1.8	1.47 ± 0.12	136.0 ± 59.2	112.3 ± 10.5
	100	89.3 ± 23.7	89.0 ± 10.5	86.3 ± 14.2	65.7 ± 7.6	10.3 ± 2.2	1.37 ± 0.03	57.7 ± 23.8	120.0 ± 15.9
Aqueous extract	10	48.3 ± 17.6†	58.7 ± 4.4	68.7 ± 3.0 <sup>b</sup>	46.7 ± 4.0	5.3 ± 0.3	1.27 ± 0.03	129.0 ± 56.0	54.3 ± 4.7
	30	61.3 ± 10.0†	57.3 ± 1.5	76.0 ± 8.0	43.3 ± 1.2	5.7 ± 0.3	1.27 ± 0.03	197.0 ± 14.4	52.7 ± 4.0
	100	56.0 ± 15.0†	89.5 ± 11.5	70.5 ± 3.5	66.5 ± 4.5	10.5 ± 4.5	1.35 ± 0.05	243.5 ± 47.5	51.5 ± 10.5

AI, atherogenic index; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. Data are means ± SEM, n = 3. \*P < 0.05 vs standard diet group; †P < 0.05 vs cafeteria diet group; + = death.

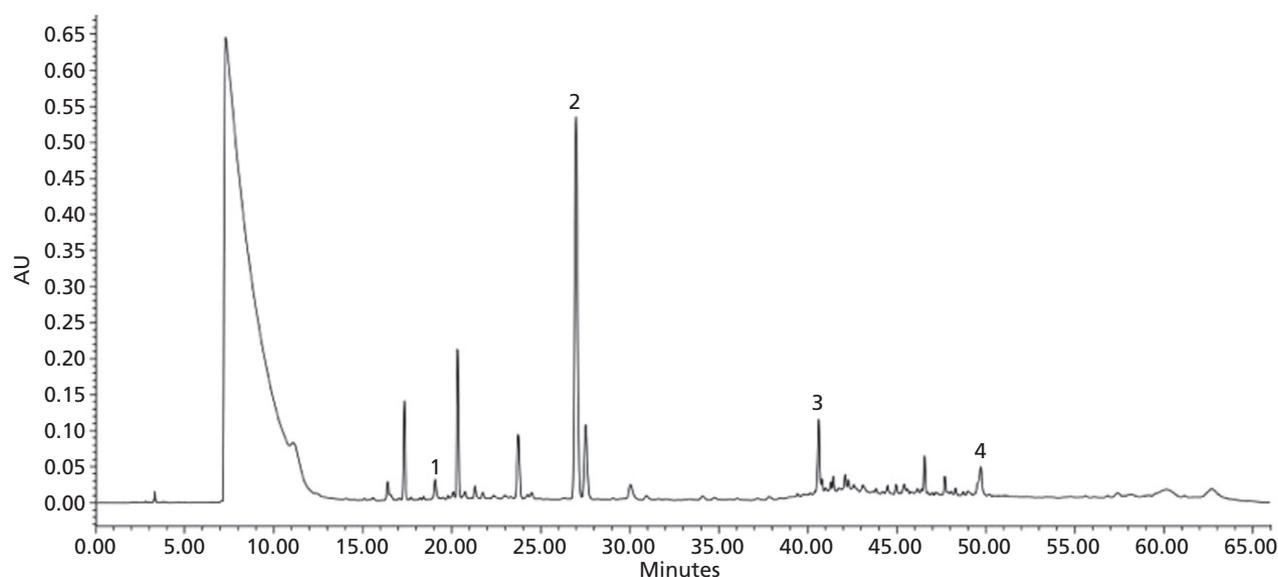
**Table 7** Effect of *Hypericum silenoides* and *Hypericum philonotis* on the forced swimming test in rats

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Duration of immobility (s)
Standard diet + Tween 80	–	94.5 ± 14.9
Cafeteria diet + Tween 80	–	174.3 ± 9.0*
Cafeteria diet + sibutramine	5	63.8 ± 32.3 <sup>†</sup>
	10	2.0 ± 2.0 <sup>†</sup>
<i>Cafeteria diet + Hypericum silenoides</i>		
Hexane extract	10	89.8 ± 6.1 <sup>†</sup>
	30	+
	100	+
Dichloromethane extract	10	174.6 ± 2.4
	30	+
	100	+
Methanol extract	10	208.6 ± 21.6
	30	184.8 ± 15.8
	100	195.8 ± 13.4
Aqueous extract	10	146.2 ± 17.1
	30	106.4 ± 4.1 <sup>†</sup>
	100	103.6 ± 9.0 <sup>†</sup>
<i>Cafeteria diet + Hypericum philonotis</i>		
Hexane extract	10	+
	30	+
	100	+
Dichloromethane extract	10	178.8 ± 19.5
	30	187.6 ± 24.2
	100	+
Methanol extract	10	131.6 ± 23.8
	30	133.0 ± 22.4
	100	184.8 ± 17.2
Aqueous extract	10	199.2 ± 18.3
	30	188.6 ± 9.8
	100	164.4 ± 12.2

Data are means ± SEM, *n* = 3. \**P* < 0.05 vs standard diet group; <sup>†</sup>*P* < 0.05 vs cafeteria diet group; + = death.



**Figure 6** Pancreatic lipase inhibitory effect of *Hypericum silenoides* (a) and *Hypericum philonotis* (b). Hexane extract (●), dichloromethane extract (○), methanol extract (■) and aqueous extract (□). Values are mean ± SEM for nine determinations. \**P* < 0.05 compared with control.



**Figure 7** Profile of *Hypericum silenoides* aqueous extract with high-performance liquid chromatography attributions of the components detected. Peak 1, chlorogenic acid; peak 2, rutin; peak 3, quercetin; peak 4, hyperforin.

**Table 8** Inhibitory effect of *Hypericum silenoides* and *Hypericum philonotis* on pancreatic lipase

Treatment	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>Hypericum silenoides</i>	
Hexane extract	NA
Dichloromethane extract	262.79 ± 0.09*
Methanol extract	NA
Aqueous extract	403.70 ± 0.08*
<i>Hypericum philonotis</i>	
Hexane extract	162.60 ± 0.02*
Dichloromethane extract	197.24 ± 0.11*
Methanol extract	NA
Aqueous extract	341.45 ± 0.07*
Orlistat	0.04 ± 0.03*

IC<sub>50</sub>, half maximal inhibitory concentration; NA, not active. Data are means ± SEM, *n* = 9. \**P* < 0.05 vs control.

potential anti-obesity agents.<sup>[42]</sup> Some of the *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts showed modest lipase inhibitory activity (Figure 6). This activity could be an additional explanation for the effect of *H. silenoides* and *H. philonotis* in reducing the body-weight gain induced in cafeteria-diet-fed rats.

## References

- Devlin MJ et al. Obesity: what mental health professionals need to know. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 854–866.
- Fujioka K. Management of obesity as a chronic disease: nonpharmacologic, pharmacologic, and surgical options. *Obes Res* 2002; 10: 116S–123S.
- WHO. 2012. Obesity and overweight. Fact sheet N°311 available from: <http://www.who.int/mediacentrefact sheets/fs311/en/> (accessed 04 November 2012).
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635–643.
- Bray GA et al. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr* 2002; 132(Suppl. 9): 2488–2491.

## Conclusions

This study demonstrated that *H. silenoides* and *H. philonotis* extracts show a significant anti-obesity activity, promoting antihyperglycaemic and hypolipidaemic activity in rats fed an experimental cafeteria diet. Moreover, both species showed an inhibitory effect on lipase activity *in vitro*. This trial provides the first scientific basis to support the popular use in Mexico of the *Hypericum* genus as an anti-obesity treatment.

## Declarations

### Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

## Funding

Leticia García-de la Cruz acknowledges fellowship support from CONACyT (170421/170421) to carry out graduate studies. This work was supported by the grants PAIP 6390-18 and DGAPA IN210112.

6. Estadella D *et al.* Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004; 20(Suppl. 2): 218–224.
7. Lladó I *et al.* Dietary-induced permanent changes in brown and white adipose tissue composition in rats. *Int J Obes* 1991; 15(Suppl. 6): 415–419.
8. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 1976; 17: 461–471.
9. Lladó I *et al.* Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese diet. *Physiol Behav* 1995; 58(Suppl. 3): 513–519.
10. Prats E *et al.* Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav* 1989; 45(Suppl. 2): 263–272.
11. Chapat JP *et al.* Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. *Mini Rev Med Chem* 2007; 7(Suppl. 1): 3–10.
12. Bays HE. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res* 2004; 12: 1197–1211.
13. Mayer MA *et al.* Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Curr Clin Pharmacol* 2009; 4(Suppl. 1): 53–61.
14. Nakayama T *et al.* Effects of three Chinese herbal medicines on plasma and liver lipids in mice fed a high fat diet. *J Ethnopharmacol* 2007; 109(Suppl. 2): 236–240.
15. Barnes J *et al.* St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(Suppl. 5): 583–600.
16. Bombardelli E, Morazzoni P. *Hypericum perforatum* L. *Fitoterapia* 1995; 66: 43–58.
17. Husain GM *et al.* Beneficial effects of a standardized *Hypericum perforatum* extract in rats with experimentally induced hyperglycemia. *Drug Discov Ther* 2009; 3(Suppl. 5): 215–220.
18. Husain GM *et al.* Anti-diabetic activity of Indian *Hypericum perforatum* L. on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline* 2008; 3: 889–894.
19. Husain GM *et al.* Hypolipidemic and antiobesity-like activity of standardised extract of *Hypericum perforatum* L. in rats. *ISRN Pharmacology* 2011; 2011: Article ID 505247, 7 pages.
20. Rodríguez-Jimenez C *et al.*, ed. *Flora del Bajío y Regiones adyacentes: Guttiferae*, 1st edn. Mexico: Edition INECOL A, 1996.
21. Mendoza-Castelán G, Lugo-Pérez R. *Plantas medicinales en los mercados de México*, 1st edn. México: UAM, 2011.
22. Hearnsh-Martínez P. *Destino común: los recolectores y su flora medicinal. El comercio de flora medicinal silvestre desde el sur-occidente poblano*. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia, 1996.
23. Bender DA. Overview of metabolism & the provision of metabolic fuels. In: Murray RK *et al.*, ed. *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc, 2009: 231–236.
24. Heal DJ *et al.* A comparison of the effects on central 5-HT function of sibutramine hydrochloride and other weight-modifying agents. *Br J Pharmacol* 1998; 125(Suppl. 8): 301–308.
25. Sánchez-Mateo CC *et al.* Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. Extracts in the forced swimming test in mice. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 541–547.
26. Lee YP *et al.* Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1169(Suppl. 2): 156–164.
27. USP 31 NF. *The United States Pharmacopeia*. Baltimore: Port City Press, 2007.
28. Naim M *et al.* Energy intake, weight gain and fat deposition in rats fed flavored, nutritionally controlled diets in a multichoice ('cafeteria') design. *J Nutr* 1985; 115(Suppl. 11): 1447–1458.
29. Rothwell NJ, Stock MJ. Energy expenditure of 'cafeteria-diet' rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry. *J Physiol* 1982; 328: 371–377.
30. Barr HG, McCracken KJ. High efficiency of energy utilization in 'cafeteria' and force-fed rats kept at 29°C. *Br J Nutr* 1984; 51: 379–387.
31. Lam DD *et al.* Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 97(Suppl. 1): 84–91.
32. Laakmann G *et al.* St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31(Suppl. 1): 54–59.
33. Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiol* 2000; 124: 507–514.
34. Di Carlo G *et al.* St John's wort: prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(Suppl. 6): 292–297.
35. Müller WE. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res* 2003; 47: 101–109.
36. Leuner K *et al.* Hyperforin – a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J* 2007; 21(Suppl. 14): 4101–4111.
37. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion – Implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; 43: 393–410.
38. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta cell function. *Endocr Rev* 2001; 22: 565–604.
39. Jacobson DA, Philipson LH. TRP channels of the pancreatic beta cells. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 179: 409–424.
40. Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 1237–1261.
41. Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today* 2007; 12: 879–889.
42. Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry* 2010; 71: 1625–1641.