



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Inducción por dieta del síndrome metabólico en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y efecto de la Gobernadora (*Larrea tridentata*).

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GEORGINA DEL VECCHYO TENORIO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ  
UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN NUTRICIÓN, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2017.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.





# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Inducción por dieta del síndrome metabólico en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y efecto de la Gobernadora (*Larrea tridentata*).

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GEORGINA DEL VECCHYO TENORIO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ  
UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN NUTRICIÓN, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2017.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/024/2017

ASUNTO: Oficio de Jurado

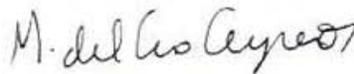
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de noviembre de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS del (la) alumno (a) DEL VECCHYO TENORIO GEORGINA con número de cuenta 98016583 con la tesis titulada: "Inducción por dieta del síndrome metabólico en el hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) y efecto de la Gobernadora (*Larrea tridentata*)", realizada bajo la dirección del (la) DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ:

Presidente	DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
Vocal	DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA
Secretario	DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
Suplente	DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ
Suplente	DRA. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de enero de 2017



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme ser miembro de esta institución y poder realizar mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 202671 que me permitió concluir mis estudios.

A mi Tutor Principal el Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez y a los miembros del Comité Tutor, Dr. Adolfo Andrade Cetto y Dra. Maricela Rodríguez Cruz, por sus sugerencias, comentarios, accesibilidad y apoyo que me permitieron corregir y mejorar este trabajo durante su desarrollo.

## **Agradecimientos a título personal**

Agradezco a la Dra. Sonia Escandón Rivera por el análisis HPLC del extracto de Gobernadora, al M. en C. Agustín Carmona, Biol. Dora Salazar, Biol. Isabel Antúnez y MVZ Mario Soriano por el mantenimiento y cuidado de los animales en el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la Dra. Pilar Durán y al Dr. Manuel Miranda Anaya, y los miembros y compañeros del Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su apoyo durante mi estancia para la realización de este proyecto.

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis doctoral a mi familia, por su apoyo constante durante la realización de este proyecto.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Resumen.....	1
Abstract.....	3
Antecedentes.....	4
El síndrome Metabólico.....	4
Epidemiología.....	4
Etiología y Patogénesis.....	5
Tratamientos.....	7
Gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ).....	7
Objetivo general del estudio.....	9

### **Etapa I. Inducción de síndrome metabólico por medio de dietas**

<b>hipercalóricas.....</b>	<b>9</b>
Antecedentes.....	9
Modelos animales de síndrome metabólico inducido por dieta.....	9
Modelos murinos de inducción de obesidad y dislipidemia por dietas altas en carbohidratos refinados.....	10
Modelos murinos de inducción de obesidad y dislipidemia por dietas altas en grasa..	12
Hámster como modelo de síndrome metabólico.....	12
Objetivo.....	13
Materiales y métodos.....	14
Animales y Dietas.....	14
Toma de muestras.....	14
Análisis de muestras.....	14
Análisis estadístico.....	16
Resultados.....	17
Peso corporal y consumo de alimento.....	17
Parámetros plasmáticos.....	21
Tolerancia a insulina.....	21
Parámetros hepáticos.....	22
Parámetros biliares.....	23
Discusión y conclusiones.....	24

### **Etapa II. Efecto de Gobernadora y NDGA en el modelo de hámster alimentado con una dieta alta en manteca de cerdo..... 26**

Antecedentes.....	26
Justificación.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
Método.....	28

Preparación del extracto etanólico de Gobernadora.....	28
Contenido de NDGA en el extracto etanólico de Gobernadora.....	28
Animales y dietas.....	29
Análisis de muestras.....	30
Análisis estadístico.....	31
Resultados.....	32
Peso corporal y consumo de alimento.....	32
Parámetros plasmáticos.....	34
Insulina y Leptina en suero.....	35
Tolerancia a insulina.....	36
Parámetros y lípidos hepáticos.....	37
Peroxidación y capacidad antioxidante en hígado.....	38
Parámetros biliares.....	39
Esteroles fecales neutros.....	40
<b>Discusión.....</b>	<b>41</b>
Genero.....	42
Ganancia de peso y obesidad.....	42
Parámetros plasmáticos.....	43
Insulina y leptina.....	44
Tolerancia a la insulina.....	45
Parámetros hepáticos.....	45
Peroxidación y capacidad antioxidante en hígado.....	47
Parámetros biliares.....	48
Esteroles fecales.....	48
Cambio de dieta grasa a dieta de mantenimiento.....	49
<b>Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
Perspectivas.....	50
Literatura citada.....	51
<b>Apéndice I. Resumen de un experimento preliminar con NDGA en dieta alta en grasa.....</b>	<b>57</b>
<b>Apéndice II. Artículo.....</b>	<b>60</b>

## Resumen

El Síndrome Metabólico es un conjunto de alteraciones que se asocian con la obesidad, que comprende diversos factores de riesgo cardiovascular tales como la dislipidemia, la hipertensión y la hiperglicemia. La Gobernadora, *Larrea tridentata* (Sesse y Moc. Ex DC, Zygophyllaceae) es un arbusto abundante en las zonas áridas del norte de México y suroeste de Estados Unidos. En medicina tradicional, la Gobernadora se utiliza para tratar diversas enfermedades, incluyendo la diabetes. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del extracto etanólico de la Gobernadora sobre algunos parámetros plasmáticos, hepáticos y biliares asociados con el síndrome metabólico, utilizando el modelo del hámster dorado alimentado con dieta hipercalórica.

Inicialmente, en el primer capítulo de la tesis, basados en reportes previos, se probó el efecto de dietas hipercalóricas purificadas y no purificadas en hámsteres machos adultos jóvenes sobre el desarrollo de parámetros relacionados con el síndrome metabólico. Las dietas purificadas ensayadas fueron altas en 1) fructosa (40%), 2) aceite de coco (10%) y 3) manteca de cerdo (20%). Como control se empleó una dieta purificada más baja en calorías con almidón. Las dietas no purificadas fueron elaboradas con dieta de mantenimiento adicionada de manteca de cerdo (20%) con o sin colesterol al 0.1 o 0.5%. La dieta con fructosa suministrada por 8 semanas, tendió a producir valores plasmáticos y hepáticos de lípidos más elevados, aunque estos no llegaron a ser significativos con respecto al control. No hubo diferencias significativas con la dieta de aceite de coco suministrada por 8 semanas. Las dietas con manteca de cerdo, tanto purificada como no purificadas suministradas por 4 u 8 semanas indujeron el mayor peso corporal y altas concentraciones de lípidos plasmáticos y hepáticos. La dieta purificada provocó que el 80% de los animales desarrollaran cálculos biliares pigmentarios. La dieta hipercalórica no purificada con manteca de cerdo y colesterol fue la que reprodujo mejor los parámetros alterados presentes en el síndrome metabólico, como son obesidad, dislipidemia y resistencia a la insulina.

En el segundo capítulo, se estudió el efecto de la adición del extracto etanólico de Gobernadora al 0.2% en la dieta no purificada con 20% de manteca de cerdo y colesterol al 0.1% (Dieta Grasa, DG) sobre parámetros asociados con el síndrome metabólico. Así mismo, se ensayó el efecto de cambiar la DG por dieta de mantenimiento con y sin 0.2% de extracto de Gobernadora. Se incluyeron como controles positivos, un grupo con DG adicionada con 3mg% de Ezetimiba y otro con dieta de mantenimiento y Ezetimiba, un inhibidor de la absorción intestinal de colesterol. El extracto de Gobernadora en la DG produjo disminución de los triglicéridos y el colesterol total en plasma, insulina y leptina en suero, así como menor obesidad, reducción en el tamaño del hígado, los lípidos totales hepáticos y el colesterol biliar. Adicionalmente, el extracto de Gobernadora en la DG aumentó la sensibilidad a la insulina y la capacidad antioxidante del hígado. El extracto de Gobernadora no modificó los triglicéridos y el colesterol del hígado, ni el porcentaje molar de colesterol en bilis ni los esteroides fecales. Por el contrario, la Ezetimiba incrementó los esteroides fecales, lo que indica que el mecanismo de acción del extracto de Gobernadora es otro, diferente a la inhibición de la absorción de colesterol. El cambio de DG a dieta de mantenimiento aumentó la peroxidación de lípidos en el hígado, pero disminuyó el colesterol plasmático, la leptina sérica, el tamaño del hígado, los lípidos totales hepáticos y en bilis las sales biliares, el colesterol y el porcentaje molar de colesterol. Mientras que la

adición de extracto etanólico a la dieta de mantenimiento, posterior al suministro de la DG, disminuyó la obesidad, la insulina sérica y la peroxidación de lípidos, e indujo una mayor reducción de colesterol plasmático, leptina sérica y tamaño del hígado, elevando el colesterol HDL y la sensibilidad a la insulina. Por lo anterior, el extracto etanólico de Gobernadora podría ser útil en el tratamiento del síndrome metabólico.

## Abstract

The Metabolic syndrome is a constellation of risk factors including obesity, dyslipidemia, hypertension and hyperglycemia, that are directly related to the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Creosote bush, *Larrea tridentata* (Sesse y Moc. Ex DC, Zygophyllaceae) is a shrub abundantly found in the deserts of Northern Mexico and Southwestern United States. In traditional medicine, it is used to treat a variety of illnesses including type 2 diabetes. The aim of the present study was to investigate the effect of creosote bush ethanolic extract on plasma, liver and biliary parameters associated with the metabolic syndrome, using the model of golden hamster fed a hypercaloric diet.

Initially, in the first chapter of this thesis, the effect of hypercaloric diets, both purified and non-purified, were tested in young adult male hamsters with the aim to characterize and validate a metabolic syndrome animal model. Purified diets consisted in high content of 1) fructose (40% w/w), 2) coconut oil (10%) and 3) lard (20%). A lower caloric content purified diet with starch was used as control. Non-purified diets consisted of maintenance diet plus lard (20%), with or without the addition of cholesterol at 0.1 or 0.5%. Animals fed the fructose diet for 8 weeks, showed higher plasma and liver lipids, but not significantly different from the control group. Both purified and non-purified diets containing lard, induced the most significant increases in body weight as well as higher plasmatic and hepatic levels of lipids. The purified diet with lard caused that 80% of the animals developed pigment gallstones. The hypercaloric non-purified diet containing lard and cholesterol was prominently associated with the appearance of metabolic syndrome related parameters such as obesity, dyslipidemia and insulin resistance.

In the second chapter of this work, the effect of the addition of 0.2% w/w creosote bush ethanolic extract to the non-purified diet containing 20% lard and 0.1% cholesterol (HFD) on parameters associated with the metabolic syndrome was studied. Also the effect of changing the HFD for a lower calorie diet (maintenance chow) with or without 0.2% creosote bush extract was assayed. As additional controls, an animal group fed a HFD plus 3mg% Ezetimibe, an inhibitor of the intestinal absorption of cholesterol, as well as a group of hamsters receiving maintenance diet plus Ezetimibe, were included. The creosote bush ethanolic extract in the HFD animal group produced a reduction of plasma triglycerides, total cholesterol, serum insulin, leptin, as well as liver size, total hepatic lipids and biliary cholesterol, besides increasing insulin sensitivity and liver antioxidant capacity. Notably, the creosote bush ethanolic extract did not modify the amount of fecal sterols. In this sense, ezetimibe increased fecal sterols, which suggests that creosote bush action mechanism does not involve impairment of intestinal cholesterol absorption. The change from HFD to maintenance chow increased lipid peroxidation, but reduced plasma cholesterol, serum leptin, liver size, and hepatic total lipids, as well as cholesterol, bile salts and the percentage of molar cholesterol in bile. Whereas the addition of creosote bush ethanolic extract to maintenance chow reduced body weight, serum insulin and lipid peroxidation, also inducing higher reductions on plasma cholesterol, serum leptin and liver size, while increasing HDL cholesterol and insulin sensitivity. These results suggest that the ethanolic extract of *Larrea tridentata* may represent an alternative treatment for the metabolic syndrome.

## **Antecedentes**

### **El Síndrome Metabólico**

Las alteraciones que caracterizan al Síndrome Metabólico fueron descritas en los años 1920s por el médico sueco Kylin, como una combinación de hipertensión, hiperglucemia y gota. Después en 1947, Vague dio atención a la grasa abdominal como el fenotipo de obesidad comúnmente asociada a anormalidades metabólicas, a su vez asociadas con diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular. (Eckel et al., 2005). En 1988 Reaven desarrolló el concepto de lo que él llamo “Síndrome X”, según el cual la obesidad *per se* puede llevar a la resistencia a la insulina (Reaven, 1988). Hasta 1998 surgió la primera iniciativa, convocada por la OMS, para desarrollar una definición internacionalmente reconocida, esta definición puede ser modificada conforme a la nueva información de sus componentes y su poder predictivo. En 2004 se unieron un grupo de expertos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) para establecer una definición unificada del síndrome metabólico y resaltar áreas donde se requiere más investigación (Eckel et al., 2005). El Síndrome Metabólico (SM) es un grupo de alteraciones que son antecedentes y factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2, caracterizado por la presencia de varias anormalidades metabólicas, de acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (IDF), el SM incluye obesidad y más 2 de las siguientes alteraciones: dislipidemia con hipertrigliceridemia y bajo colesterol HDL, hipertensión e hiperglucemia en ayuno. También se consideran los siguientes criterios adicionales para investigación: distribución anormal de grasa, dislipidemia aterogénica (elevada apo B, o partículas pequeñas de LDL), disglucemia, resistencia a la insulina, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), estado proinflamatorio, hipercoagulabilidad y microalbuminuria (Alberti et al., 2006; Cefalu, 2006; Haas y Biddinger, 2009). La hiperleptinemia debida a la resistencia a leptina, podría ser un componente etiológico del síndrome metabólico (Zimmet et al., 1999, Wang et al., 2010). Muchos individuos obesos presentan mayor concentración de leptina que los sujetos delgados, debido a su mayor cantidad de grasa corporal (Zimmet et al., 1999, Moon et al., 2013).

### **Epidemiología**

En México, la prevalencia del síndrome metabólico en adultos, de acuerdo a los criterios de la IDF es del 49.8% (Rojas et al., 2010). El tratamiento adecuado de cada componente podría prevenir o retardar la aparición de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular (Rojas et al., 2010). La etiología del SM es compleja, ya que incluye factores hereditarios (genética, programación fetal como el síndrome del bebe pequeño, fenotipo ahorrativo) y adquiridos (consumo excesivo de calorías, estilo de vida sedentario, obesidad, aumento de edad; Varga et al., 2010).

Una consecuencia del síndrome metabólico es la diabetes tipo 2, que es un grupo de condiciones metabólicas crónicas, caracterizada por niveles elevados de glucosa resultado de la incapacidad del cuerpo para producir insulina o presentar resistencia a la acción de la insulina, o ambos (Deshpande et al., 2008). El síndrome metabólico puede preceder el desarrollo de la diabetes por muchos años y a su

vez es 3 a 4 veces más común que la diabetes. Estos desórdenes coexistentes representan un serio problema de salud pública. En México la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 se incrementó de 4.6% en 1993 a 22.8% en 2006 (Arredondo y de Icaza., 2009). El impacto no solo es evidente en mortalidad, sino también en morbilidad. Esta morbilidad representa una enorme carga social y económica para los individuos y sus familias, así como para el sistema de salud y la sociedad en general, ya que la diabetes es una enfermedad muy cara para tratar y tiene alta prioridad como problema de salud pública (Arredondo y de Icaza., 2009).

Así mismo, la presencia de cálculos biliares de colesterol esta frecuentemente asociada al síndrome metabólico (Grundy et al., 2004a) y relacionada con la obesidad. Donde la bilis de personas obesas es más litogénica que la de personas no obesas, es decir que la bilis de personas obesas tiene mayor proporción de colesterol que de lípidos “solubilizantes” (ácidos biliares y fosfolípidos). Esto predispone la cristalización del colesterol y la formación de cálculos biliares. La razón primaria de la bilis litogénica en personas obesas es el incremento en la síntesis total de colesterol (Grundy., 2004c). En México y Estados Unidos, 10 a 15% de la población adulta tiene cálculos biliares (Méndez-Sánchez et al., 2007). En un estudio realizado en México se encontró que de 245 sujetos analizados, el síndrome metabólico estaba presente en 40% de los pacientes con cálculos biliares, comparado con 17.4% en los que no los presentaban (Méndez-Sánchez et al., 2005).

### ***Etiología y Patogénesis***

Un estilo de vida sedentario, dieta hipercalórica con base en grasas, carbohidratos refinados y características genéticas son factores que influyen en la expresión clínica del SM. La hipótesis del “ambiente tóxico” en el aumento en la frecuencia de obesidad propone que en las sociedades con estilos de vida occidentales e industrializadas, este incremento se debe a factores ambientales, como mayor disponibilidad y consumo de alimentos procesados altos en grasa y calorías, ingestión de porciones grandes de esos productos, además de sedentarismo (Carlos Poston y Foreyt, 1999). La inactividad física o sedentarismo promueve el desarrollo de obesidad y modifica la sensibilidad muscular a la acción de la insulina. El envejecimiento va acompañado de pérdida de masa muscular e incremento de grasa corporal, particularmente en el abdomen, estos cambios también podrían incrementar la resistencia a insulina (Grundy et al., 2004b). En contraste con el metabolismo sistémico de la glucosa, el hígado es el principal sitio para metabolizar 4 compuestos asociados al desarrollo del SM: grasas *trans*, aminoácidos de cadena ramificada, etanol y fructosa. Los niveles de estos compuestos en el organismo no son regulados por la insulina y producen intermediarios metabólicos en el hígado, que al ser captados en exceso promueven la lipogénesis y el almacenamiento ectópico de grasa. Las grasas *trans* se adicionan a los alimentos procesados para prolongar su estancia en anaqueles comerciales, pues las bacterias no degradan estos ácidos grasos. Al igual que las bacterias, las mitocondrias humanas no pueden romper las grasas *trans* por  $\beta$ -oxidación en el hígado, promoviendo la lipogénesis y el almacenamiento ectópico de grasa (Bremer et al., 2012). Los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) normalmente se utilizan para la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Sin embargo, en exceso se desvían hacia la producción de energía y disminuyen la sensibilidad a la insulina al estimular la

fosforilación de serina del IRS-1 y reducen la vía de señalización de PI3K (Copps y White, 2012). El consumo moderado de etanol mejora la sensibilidad a la insulina, el consumo crónico y excesivo de etanol provoca que éste tenga un metabolismo en el hígado similar al de la fructosa, pues dentro del hepatocito y en presencia de otros sustratos calóricos, tanto el etanol como la fructosa se emplean para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, aumentando también malonil-CoA que inhibe el transportador de ácidos grasos mitocondrial CPT-1, inhibiendo la  $\beta$ -oxidación y estimulando la lipogénesis; además es convertido en acetaldehído, que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno, que dañan al hígado (Bremer et al., 2012). Las dietas altas en grasas saturadas inducen mayor peso corporal, resistencia a la insulina e hiperlipidemia en animales y humanos, pero el énfasis en dietas y alimentos reducidos en grasa no ha dado beneficios significativos en reducir la obesidad global (Basciano et al., 2005). El incremento en el consumo de carbohidratos refinados, particularmente altos en sacarosa y fructosa es un factor importante en el incremento del SM. El jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS) se agrega a bebidas como refrescos y jugos, también se incorpora a alimentos empacados como cereales y panadería. El consumo de fructosa se ha incrementado en las últimas décadas por el uso de estos jarabes, que contienen entre 55 y 90% de fructosa. El hígado al estar expuesto a estas cantidades de fructosa lo lleva a estimular la lipogénesis y acumulación de TG, que a su vez contribuye a reducir la sensibilidad a la insulina y a la intolerancia a la glucosa (Basciano et al., 2005). La teoría de la lipotoxicidad implica que los lípidos almacenados en forma de triglicéridos son biológicamente inertes y que las disfunciones metabólicas se deben principalmente a la exposición de las células a los ácidos grasos libres. Esta exposición resulta en disfunción celular, inflamación y hasta muerte celular. Los riesgos a la salud aparecen cuando la capacidad de almacenamiento de los adipocitos no puede acomodar el exceso de lípidos. Mientras los ácidos grasos sean almacenados como triglicéridos en los adipocitos, la lipotoxicidad celular no ocurrirá (Sørensen et al., 2010).

De acuerdo al grupo de Vidal-Puig (Lelliot et al., 2004), el tejido adiposo blanco es el órgano clave para el desarrollo del síndrome metabólico. La lipotoxicidad puede prevenirse evitando la acumulación de grasa, o con un incremento en la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo blanco por hiperplasia en vez de hipertrofia, o al incrementar la oxidación de ácidos grasos en otros tejidos. Si el depósito energético se genera mediante la hipertrofia de los adipocitos existentes, provoca en ellos alteraciones funcionales como: 1) Inducir la activación de una respuesta inflamatoria intracelular mediante vías de señalización como el NF $\kappa$ B y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno por activación de enzimas como la NADPH oxidasa, creando un estado de estrés oxidativo e inflamación. 2) Cambios en la síntesis de adipocinas, incrementando las citocinas proinflamatorias tales como: TNF $\alpha$ , IL-6, PAI-1, MCP-1, además de la disminución de adiponectina y reclutamiento de células inflamatorias al interior del tejido adiposo, lo que incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias y la generación de especies reactivas de oxígeno. Estos eventos contribuyen al estado de estrés oxidativo e inflamación subclínica crónica presente en los pacientes con obesidad (Flores-Lázaro et al., 2011).

La expresión del SM también tiene control genético, que influye en la respuesta a factores ambientales. Por ejemplo, los polimorfismos en genes que afectan el metabolismo de lipoproteínas asociados a la dislipidemia en personas obesas, o predisposición genética a secreción defectuosa de insulina combinada con resistencia a insulina, que puede incrementar la glucosa plasmática a niveles

anormales. De acuerdo a la “hipótesis del genotipo ahorrativo” propuesta por Neel en 1962, los individuos que viven en ambientes hostiles, con alimentos limitados e inestabilidad para obtenerlos, maximizan su probabilidad de supervivencia si maximizan el almacenamiento de energía sobrante, esta variación seleccionada y favorecida durante la desnutrición, es desfavorable cuando ocurre una alimentación abundante, lo que predispone a estos individuos al SM. La “hipótesis del fenotipo ahorrativo” propuesta por Hales y Barker en 1992, propone que los bebés con malnutrición intrauterina se adaptaron reduciendo su gasto energético; postnatalmente se convierten en ahorradores de energía y con un aumento en la alimentación, esta adaptación ahorrativa ya no es benéfica para estos individuos y desarrollan SM. Esta hipótesis se sustenta en observaciones de recién nacidos con bajo peso corporal que tienen un alta predisposición a desarrollar resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 en la edad adulta (Kaur, 2014).

### ***Tratamientos***

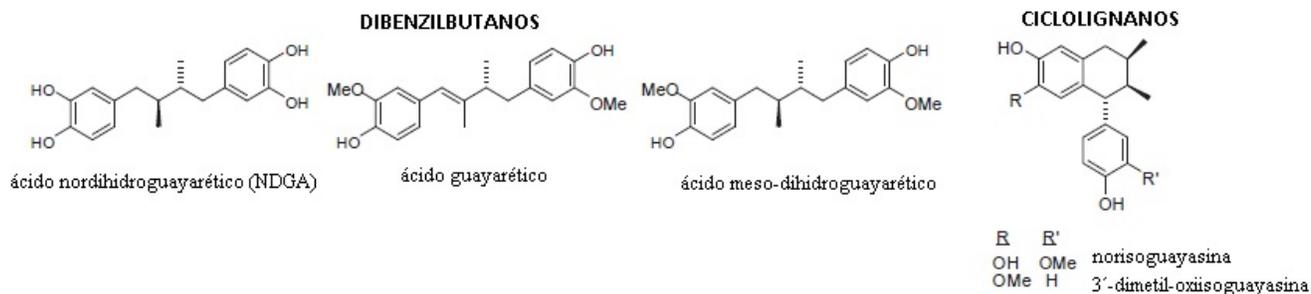
Los tratamientos del SM incluyen cambios en el estilo de vida que lleven a la pérdida de peso corporal. Debido a que los medicamentos disponibles son efectivos en reducir componentes específicos del SM, la administración farmacológica óptima debe ser individualizada. Como la pérdida de peso en pacientes con SM incrementa la sensibilidad a insulina, se han utilizado medicamentos anti-obesidad como fentermina, fentermina/topiramato de liberación extendida, lorcaserina, orlistat y liraglutida, un agonista del péptido similar a glucagon-1 (GLP-1). Las tiazolidinedionas o la metformina, se recomiendan para pacientes con resistencia a insulina. Los agentes reductores de colesterol como las estatinas se recomiendan para las dislipidemias aterogénicas, y la mayoría de los pacientes con SM son elegibles para usarlas. Los derivados del ácido fibríco reducen eventos de enfermedad cardiovascular en pacientes con hipertrigliceridemia y con bajo colesterol HDL. En algunos pacientes, el tratamiento de la dislipidemia aterogénica requiere la combinación de estatinas y derivados del ácido fibríco. Muchos de estos medicamentos tienen efectos secundarios adversos, por ejemplo la lorcaserina, aprobada para adultos obesos con presión alta, colesterol alto o diabetes tipo 2, produce dolores de cabeza, mareos, fatiga, náusea, boca seca y constipación (Lim y Eckel, 2014).

### **Gobernadora, *Larrea tridentata* (Moç. & Seseé ex DC.) Coville (1893).**

La medicina tradicional mexicana es utilizada tanto por mexicanos como por mexicano-americanos por razones culturales. Uno de los remedios más comunes es el uso de hierbas y plantas para tratar diversas enfermedades, entre estas la diabetes tipo 2. Aunque muchos de estos remedios son seguros, los profesionales de la salud deben estar pendientes de incidentes debido a los efectos secundarios adversos de estas hierbas o a interacciones con medicamentos prescritos (Montiel Tafur et al., 2009).

El género *Larrea* comprende cinco especies, distribuidas desde los desiertos en el suroeste de los Estados Unidos de América (*Larrea tridentata*), hasta la Patagonia en Argentina (*Larrea ameghinoi*, *Larrea nitida*, *Larrea divaricata* y *Larrea cuneifolia*), donde se les llama jarillas. Es un arbusto

dominante y es reconocida como un componente importante de las comunidades de plantas en ambientes desérticos (Palacios y Hunziker, 1972; Mabry et al., 1977). Es una planta prolífica adaptada para sobrevivir en el desierto. Provoca desplazamiento de otras especies, impidiendo de esta manera la diversificación de la flora en el lugar donde se desarrolla. Bajo condiciones de humedad favorables inhibe el crecimiento de la vegetación que se desarrolla a su alrededor. Posee un gran número de compuestos químicos en sus hojas, aparentemente como anti-herbívoros. (Vázquez-Yanes et al., 1999). La Gobernadora pertenece a la familia *Zygophyllaceae*, es también conocida como Hediondilla, Chaparral o “Creosote bush”, es un arbusto que se distribuye abundantemente en las zonas áridas del norte de México en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sonora, Zacatecas, Baja California Norte y Sur y en el suroeste de Estados Unidos de América. Entre las plantas de zonas áridas del hemisferio occidental, las especies de *Larrea* son las más diversas químicamente. Estas plantas producen ceras complejas, compuestos volátiles, saponinas y otros triterpenos, y grandes cantidades de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides (Mabry y Bohnstedt, 1981). La resina que cubre sus hojas posee flavonoides y lignanos, como el ácido nordihidroguayarático (NDGA), un compuesto polifenólico que se usa como antioxidante (Konno et al., 1990) presente en todas las especies de *Larrea* (Mabry y Bohnstedt., 1981), habiendo una ligera diferencia en su concentración entre las razas de ploidía en lo que se avanza a través del Desierto Chihuahuense (2.62%) hacia el Sonorense (3.84%) y hacia el Mojave (4.86%) (Gisvold 1948; Downum et al., 1988). Estudios interpoblacionales de *Larrea tridentata* realizados en el Desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de NDGA encontradas en la resina de las hojas variaron en función de la latitud y la época del año, con reducciones significativas entre Abril y Julio (Downum et al., 1988), así como con factores ecológicos, ya que la concentración de NDGA puede verse reducida por la contaminación ambiental provocada por concentraciones elevadas de ozono, lo que hace a la *Larrea tridentata* más vulnerable a los herbívoros (Gonzalez-Coloma et al., 1988). Otros lignanos presentes estructuralmente relacionados al NDGA son lineales como el ácido guayarático, el ácido meso-dihidroguayarático y los ciclolignanos norisoguayasina y su derivado 3-metilo (**Figura 1.**, Gnabre et al., 2015). Se han aislado de la Gobernadora algunos flavonoides glicosilados, sapogeninas, aceites esenciales, alcaloides alogénicos (Argueta, 1994) y ceras (Romo de Vivar, 1985). *Larrea tridentata* contiene el 0.1% de su peso seco como aceites volátiles, principalmente monoterpenoides y sesquiterpenoides aromáticos (Mabry y Bohnstedt., 1981; Xue et al., 1988). La extracción con etanol de hojas y talluelos de *Larrea tridentata*, realizado a temperatura ambiente, rinde un 10% de resina en base seca, que contiene 26% de NDGA (Belmares et al., 1981). La resina representa del 10 al 25% del peso seco de la planta, y el NDGA representa hasta el 40% del peso seco de la resina (Mabry et al., 1977; Tyler, 1994). El 60% restante es una mezcla compleja de flavonas parcialmente metoxiladas (Mabry et al., 1977). Los productos y componentes químicos de todas las especies de *Larrea* se encuentran resumidos en Mabry et al., 1977; Mabry y Bohnstedt., 1981.



**Figura 1. Estructura de los principales lignanos** presentes en las especies de *Larrea*, incluyendo la Gobernadora (Gnabre et al., 2015).

Extractos de esta planta, como té (“Agua de uso”) o extracto alcohólico de hojas y talluelos se utilizan con fines medicinales en el norte de México y sur de EUA para tratar diversas enfermedades, como cálculos renales y biliares (Timmermann 1981, Vázquez-Yanes et al., 1999, Winkelman 1989), así como para el tratamiento de la diabetes (Winkelman 1989, Arteaga et al., 2005). También se utiliza para tratar enfermedades del hígado y como tónico hepático (Sheikh et al., 1997; Brent, 1999). Sin embargo, debido a su alto contenido del antioxidante NDGA, se comercializaron en EUA cápsulas y tabletas de planta desecada y pulverizada como suplementos nutricionales, lo cual llegó a inducir hepatotoxicidad (Arteaga et al., 2005b). La principal vía de eliminación del NDGA en la orina es en forma de conjugados de ácido glucurónico (Lambert et al., 2002).

El extracto de Gobernadora no ha sido estudiado en el tratamiento del síndrome metabólico, el cual tiene una mayor incidencia en la población y, a diferencia de la diabetes tipo 2, es un padecimiento que puede curarse completamente. Así mismo, como el tratamiento del síndrome metabólico y de la diabetes tipo 2 incluyen como componentes principales el incremento de actividad física y dieta baja en grasa y carbohidratos, en este trabajo analizamos el efecto del extracto como un coadyuvante en una terapia de cambio de dieta como parte del tratamiento del síndrome metabólico en el modelo de hámster.

## Objetivo general del estudio

El presente estudio tiene por objeto establecer el efecto del extracto etanólico de la Gobernadora sobre algunos parámetros plasmáticos y hepáticos asociados con el síndrome metabólico, utilizando el modelo de hámster dorado con dieta hipercalórica.

## **Etapas I. Inducción de síndrome metabólico por medio de dietas hipercalóricas.**

### Antecedentes

### Modelos animales de síndrome metabólico inducido por dieta

Tres argumentos principales se han mencionado para justificar el uso de animales en experimentación biomédica: 1) Los animales proveen un sistema biológico complejo, necesario para ciertos estudios, a diferencia de los cultivos celulares, 2) permiten controlar y estandarizar la influencia

genética y ambiental y 3) se pueden aplicar muestreos e intervenciones invasivas que en humanos no son ni ética ni legalmente posibles. En el síndrome metabólico los modelos animales se utilizan para probar nuevas hipótesis, descubrir mecanismos patofisiológicos y desarrollar nuevos tratamientos. El entendimiento de los modelos y su relevancia para diferentes propósitos es crucial para optimizar su uso. No hay un modelo único, ideal y al mismo tiempo general para el síndrome metabólico, por lo tanto hay muchas especies y cepas usadas para estudiar sus diferentes aspectos (Varga et al., 2010).

Los modelos animales de inducción por dietas permiten estudiar el papel de dietas no balanceadas en el síndrome metabólico. Muchos roedores no desarrollan el síndrome metabólico espontáneamente cuando son alimentados con dieta estándar para roedores, por lo que se requieren dietas especiales para precipitar alteraciones similares a las encontradas en el síndrome metabólico en humanos (Varga et al., 2010). Las diversas dietas empleadas se pueden dividir en dos categorías: las basadas en alimento estándar para roedores (Chow) o no purificadas y las purificadas, que emplean en su elaboración ingredientes más refinados como fuente de carbohidratos, proteínas y lípidos, como sacarosa, caseína y aceites. Las dietas comerciales Chow proveen nutrición completa y adecuada, generalmente contienen ingredientes de origen natural como granos, cereales, harina de pescado o de soya, generalmente complementados con vitaminas, minerales y grasas. Debido al origen natural de los ingredientes, puede haber mucha variabilidad en los lotes, aunque sean del mismo fabricante. Las fórmulas de las dietas Chow generalmente son cerradas, la cantidad de cada ingrediente es un secreto del fabricante y para modificarse se deben agregar carbohidratos o grasas o ambos. En las dietas purificadas cada nutriente es aportado por un ingrediente separado y purificado, generalmente son formulas abiertas, publicadas a disposición de la comunidad científica, con la ventaja de ser reproducibles o modificables de acuerdo a lo que se desea estudiar (Ulman et al., 2005; Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 1995).

### **Modelos murinos de inducción de obesidad y dislipidemia por dietas altas en carbohidratos refinados**

El incremento en el consumo de carbohidratos refinados, como jarabe de fructosa y sacarosa, se ha asociado a ganancia de peso corporal, elevación de triglicéridos en la sangre y resistencia a insulina en humanos y animales. (Gajda et al., 2007). Modelos animales de obesidad y síndrome metabólico se han desarrollado con base en dietas altas en fructosa (Kasim-Karakas et al., 1996; Basciano et al., 2005; Taghibiglou et al., 2000) o sacarosa (Pagliassotti et al., 1996). Estas dietas tienden a incrementar la cantidad de lípidos acumulados en el organismo o en el hígado, en particular por fructosa (Basciano et al., 2005), provocando lipotoxicidad. Las ratas Wistar son modelos establecidos de resistencia a insulina e hipertrigliceridemia inducidas por sacarosa (Pagliassotti et al. 1996). Estos fenotipos se desarrollan en dos semanas cuando los animales son alimentados con dieta que contiene sacarosa al 68% (en peso) en vez de almidón de maíz. La insulina basal en el plasma se eleva con la dieta de sacarosa 52 y 55% a las 5 y 8 semanas, respectivamente, en comparación con la dieta de almidón de maíz. Los triglicéridos plasmáticos y hepáticos también fueron significativamente mayores en la dieta con sacarosa (88 y 103% en plasma y 70 y 92% en hígado, a las 5 y 8 semanas respectivamente, (Pagliassotti et al. 1996). Parece

que la fructosa componente de la sacarosa es responsable de las alteraciones producidas por las dietas altas en el disacárido. A menos que sean alimentados durante largos periodos, estas dietas altas en fructosa o sacarosa no producen ganancia excesiva de peso (Gajda et al., 2007). Por otro lado, mientras que en las ratas macho, las dietas altas en fructosa o en sacarosa producen las alteraciones señaladas, en contraste, las ratas Wistar hembra parecen protegidas contra los cambios en el metabolismo inducidos por estas dietas (Horton et al., 1997). Esta protección ya no se presenta después de la ovariectomía, lo que sugiere que las hormonas sexuales femeninas confieren protección contra los efectos de una dieta alta en fructosa (Tappy y Le, 2010). Otros dos modelos comúnmente estudiados son las ratas espontáneamente hipertensivas (SHR) alimentadas con dieta alta en sacarosa, y las ratas Sprague Dawley alimentadas con fructosa (SDR), que desarrollan resistencia a insulina, hiperinsulinemia e hipertensión. Los dos modelos fueron comparados en su habilidad para inducir características del síndrome metabólico. Ratas SHR recibieron sacarosa al 12% en el agua de beber, mientras que ratas Sprague Dawley recibieron dieta con fructosa al 60% durante 7 semanas. Estas últimas tuvieron incremento del 13 % en la presión sistólica, del 81% en insulina, 215% en triglicéridos y 10% en colesterol total plasmáticos; el área bajo la curva después de una carga de glucosa fue 19.6% más alta en comparación con su control. En cambio las ratas SHR alimentadas con sacarosa en el agua solo tuvieron incremento del 5 % en la presión sistólica y el área bajo la curva después de una carga de glucosa fue solo 6.3% más alta, también en comparación con su control. Por tanto, el modelo de ratas Sprague Dawley con fructosa representa mejor las características del síndrome metabólico adquiridas por la dieta alta en carbohidratos y el ambiente, mientras que las ratas hipertensas con sacarosa son menos afectadas por la dieta, pero muestran la aparición espontánea predominantemente genética del síndrome metabólico. Estas diferencias deben ser tomadas en cuenta al elegir un modelo para estudiar las características del síndrome metabólico (Oron-Herman et al., 2008). Un modelo que permite ver cambios metabólicos a corto plazo es el de ratas Wistar macho adultas tratadas con sacarosa al 20% o más en el agua *ad libitum* y dieta normal de mantenimiento durante 8 semanas. Con este tratamiento ocurre un incremento de peso corporal, grasa abdominal, insulina y triglicéridos plasmáticos y presión sanguínea, así como intolerancia a glucosa, asociado con un aumento en los transportadores GLUT2 en el páncreas, por lo que hay sobreestimulación de células beta e hipersecreción de insulina (Larqué et al., 2011).

Los modelos con dietas altas en grasa, sacarosa o fructosa desarrollan hipertrofia del tejido adiposo blanco, lipotoxicidad y síndrome metabólico (Basciano et al., 2005). En el modelo de dieta alta en fructosa, la entrada de ésta al hígado, sin regulación mediada por insulina, lleva a un incremento en la lipogénesis *de novo* y síntesis de triglicéridos. Los triglicéridos y ácidos grasos libres sintetizados se acumulan en el hígado, lo cual conduce a lipotoxicidad y reducción de la sensibilidad a insulina. La fructosa *per se*, a diferencia de la glucosa, no estimula la secreción de insulina o leptina. La estimulación en la secreción de estas hormonas ocurre después de la inducción de la resistencia a insulina comúnmente observada con dietas altas en fructosa en humanos y modelos animales (Basciano et al., 2005), siendo las ratas Wistar más susceptibles y responsivas a desarrollar estos parámetros consumiendo agua con elevadas concentraciones de carbohidratos (Chen et al., 2011; Larqué et al., 2011).

## **Modelos murinos de inducción de obesidad y dislipidemia por dietas altas en grasa**

La obesidad es un elemento clave del síndrome metabólico, muchos roedores comúnmente ratas y ratones tienden a volverse obesos con dietas altas en grasa. El desarrollo de intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, elevación de los triglicéridos y otros parámetros, dependen de la cepa, género y fuente de grasa incluida en la dieta. Numerosas dietas altas en grasa para roedores están disponibles a nivel comercial, en las cuales tanto la cantidad como el origen de la grasa varían. Por lo general se utilizan dietas purificadas, aunque también se utiliza dieta estándar de mantenimiento con grasa adicionada, así como otros ingredientes para no provocar deficiencias nutricionales. Para inducir obesidad se utilizan dietas con hasta 45% de Kcal totales como grasa (High Fat Diet, por sus siglas en inglés, HFD) o por arriba de 50% de grasa (Very High Fat Diet, por sus siglas en inglés, VHFD). Las VHFD inducen cambios más robustos en los diferentes parámetros, sin embargo, si se estudia el efecto de nutrientes o fármacos, el grado con que se expresan los parámetros puede ocultar un efecto de las sustancias probadas, por lo que en esos casos es mejor utilizar dietas HFD o hasta bajas en grasa (Low Fat Diet, por sus siglas en inglés, LFD: 10% de grasa) (Gajda et al., 2007). En modelos de desarrollo del síndrome metabólico, los ratones C57BL/6J responden mejor con dietas altas en grasa, mientras que las ratas Wistar son más susceptibles a la sacarosa en el agua. Esta reportado que ratones C57BL/6J machos tratados con dieta alta en grasa, presentaron incremento de peso corporal, grasa epididimal, glucosa, insulina, y colesterol séricos, y resistencia a insulina. Estos parámetros también se presentaron elevados en ratas Wistar macho con dieta grasa, sin embargo, fue con dieta estándar y sacarosa al 30% en el agua donde el incremento fue más significativo (Chen et al., 2011). En otro estudio hecho en ratas Wistar macho alimentadas durante 90 días, el grupo con dieta alta en grasa con colesterol y con sacarosa al 5% en el agua, presentó incremento de peso corporal, peso del hígado, triglicéridos y colesterol hepático, con mayores concentraciones séricas de glucosa, colesterol y leptina, esta dieta fue más efectiva para producir parámetros del síndrome metabólico que la dieta con sacarosa al 20% en el agua de beber y dieta normal de mantenimiento, excepto en la concentración de triglicéridos e insulina séricos, los cuales fueron mayores en este grupo (Torres-Villalobos et al., 2015).

## **Hámster como modelo de síndrome metabólico**

En el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) también conocido como hámster sirio, alimentado con dietas altas en fructosa o sacarosa desarrolla algunos parámetros del SM. Un estudio encontró que hámsteres alimentados por 2 semanas con dieta alta en fructosa (60%) presentó un aumento del 18% en el peso corporal y 22% en el peso del hígado, concentraciones de triglicéridos plasmáticos 221% más elevadas y 25% de los hepáticos, además de 186% más de insulina plasmática, que los alimentados con dietas de mantenimiento o alta en sacarosa. Estos últimos no fueron diferentes del control, excepto por un incremento del 71% en la insulina plasmática (Kasim-Karakas et al., 1996). En otro estudio, hámsteres dorados también recibieron dieta con fructosa al 60% durante 2 semanas, hubo incrementos plasmáticos del 50% en colesterol, del 185% en triglicéridos, del 133% en insulina y del 50% en ácidos grasos libres, resistencia a insulina por pinza hiperinsulinémica euglicémica y 4.6 veces mayor producción de VLDL-apoB, tanto *in vivo* como en hepatocitos cultivados. Este modelo ofrece ventajas

sobre el modelo de rata alimentada con fructosa, en que el metabolismo de lipoproteínas apoB del hámster es más parecido al de los humanos, porque el hígado del hámster produce VLDL solamente con apoB-100 y con una densidad similar a la de la VLDL de humano, en cambio la rata secreta apoB-48 y apoB-100 (Taghibiglou et al., 2000).

El hámster dorado tiene vesícula biliar y un metabolismo de colesterol similar al de los humanos, la naturaleza y composición de los ácidos biliares hidrofóbicos y la proporción de tauro y glicoconjugados es similar en hámsteres y humanos (Combettes-Souverain et al., 2002). Es un buen modelo para estudiar alteraciones que se presentan en el síndrome metabólico de humanos, porque su metabolismo de colesterol y lipoproteínas, así como su reacción a los lípidos de la dieta, es similar a los humanos (Bravo et al., 1994). Estas características lo hacen útil para estudios de dislipidemias, debido a que pueden inducirse cambios marcados en la saturación de colesterol plasmático y biliar por medio de dietas con fórmulas específicas (Valasek et al., 2008), como con dieta alta en manteca de cerdo y colesterol en concentraciones que van del 0.1% al 0.9%, que provoca incrementos en el colesterol y triglicéridos plasmáticos (Zhang et al., 2009b; Wang et al., 2001; van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008). Se han desarrollado dietas altas en aceite de coco y colesterol, que en hámsteres producen mayor concentración de colesterol total y triglicéridos, aumento en el peso del hígado y del colesterol hepático, en comparación con hámsteres alimentados con dieta con aceite de coco, sin colesterol (Lecker et al., 2010). Dietas de manteca de cerdo con niveles de colesterol entre 0.1 a 0.9% producen en hámsteres mayor incremento de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol hepático y adiposo, que en ratas, lo que muestra que los hámsteres son hiperresponsivos al colesterol de la dieta. Las ratas a diferencia de los hámsteres, regulan el colesterol total y LDL más rápido, manteniéndolos en bajos niveles bajos y con altos valores de colesterol HDL, por lo que hay menor acumulación de colesterol hepático, y no se incrementa el colesterol sérico en respuesta al incremento de este lípido en la dieta; además eliminan más eficientemente el colesterol y los ácidos biliares a través de las heces (Zhang et al., 2009b).

**Objetivo:** Establecer el efecto de dietas hipercalóricas altas en fructosa o grasas como manteca de cerdo o aceite de coco, con o sin colesterol, sobre algunos parámetros relacionados con el síndrome metabólico, que permitan estudiar posteriormente el efecto de Gobernadora.

## **Materiales y métodos:**

### **Animales y Dietas**

Se realizaron 5 experimentos en los que se montaron grupos de 6 hámsteres machos de la colonia del bioterio de la Facultad de Ciencias, de la misma edad y con peso corporal similar. Cada grupo recibió *ad libitum* una de las dietas purificadas o no purificadas mostradas en la Tabla 1. En experimentos con dietas purificadas se empleó una dieta con almidón al 35% como control (Tabla 1), mientras que en experimentos con dieta no purificada se empleó Nutricubos Purina para roedores como control y como base de las dietas experimentales.

Las dietas fueron suministradas por periodos de tiempo entre 4 y 9 semanas, según se señala en la sección de resultados.

Cada grupo se mantuvo en jaulas de acero inoxidable con cama de aserrín y recibieron las dietas y agua corriente *ad libitum*. Los animales fueron pesados semanalmente y se determinó el consumo de alimento suministrando una cantidad determinada y midiendo el restante cada tercer día.

### **Toma de muestras**

Al final del periodo experimental, los animales, en ayuno desde la noche anterior, fueron anestesiados con pentobarbital (63mg/kg p.c.) y se tomaron muestras de sangre por seno retrorbital con capilares heparinizados y no heparinizados. Se separaron el plasma o suero por centrifugación (Microspin 24, Vulcon Technologies).

Después de la toma de muestras de plasma y suero, o durante la última semana del periodo experimental, a los animales bajo anestesia con pentobarbital (63mg/kg p.c.), se les realizó una prueba de tolerancia a insulina, por inyección de 0.05 UI de insulina humana recombinante de acción rápida (Humulin R, Lilly) intraperitoneal. Se determinó glucosa antes y después de 5, 10 y 15 min de la inyección de insulina.

Inmediatamente después, los animales fueron sacrificados por exceso de anestesia (pentobarbital). Se colectó la bilis vesicular y se diluyó 1:1 con isopropanol. Se diseccionó y peso el hígado y la grasa epididimal.

### **Análisis de muestras**

Se determinaron glucosa, triglicéridos y colesterol total y HDL en plasma por ensayos enzimáticos colorimétricos utilizando los reactivos Spinreact (Girona, España).

**Tabla 1. Composición de dietas experimentales \***

Ingredientes	Dietas						
	A	F	C	M	PM	PMC 0.5%	PMC 0.1%
Purina					70	70	70
Fructosa		40					
Sacarosa		20.85	55.53	19.85			
Almidón	25			15			
Glucosa	35						
Dextrina				10			
Caseína	24	24	24	24	6.156	6.156	6.9
Celulosa	5	3	3	3	1.5	1.0	1.5
Aceite de coco			10				
Manteca de cerdo				20	20	20	20
Aceite de maíz	4	4					
Colesterol		0.05		0.05		0.5	0.1
Metionina	0.67	0.4	0.67	0.4	0.12	0.12	0.12
Colina	0.2	1.1	0.2	1.1	0.06	0.06	0.042
Minerales <sup>1</sup>	5	5	5	5	1.5	1.5	1.05 <sup>3</sup>
Vitaminas <sup>2</sup>	1.6	1.6	1.6	1.6	0.666	0.666	0.3 <sup>4</sup>
Kcal/kg	3786	3828	4098	4634	4283	4283	4297

\*Valores en porcentaje peso a peso. <sup>1</sup> Mezcla con 80% de Salt Mixture #2 U.S.P. XIII y 20% de Supplement to USP #2 Salt Mixture (ICN Biomedicals, Inc.). <sup>2</sup> Vitamin Diet Fortification Mixture (ICN Biomedicals, Inc.). <sup>3</sup> Mezcla de minerales AIN-93M-MX (MP Biomedical, LLC). <sup>4</sup> Mezcla de vitaminas AIN-93-VX (MP Biomedical, LLC). Valor energético de Nutricubos Purina: 3683 kcal/kg dieta. Dieta Almidón (A), Dieta Fructosa (F), Dieta Aceite de Coco (C), Dieta Manteca (M), Dieta Purina-Manteca (PM), Dieta de Purina Manteca y Colesterol al 0.5% (PMC 0.5%) y Dieta de Purina Manteca y Colesterol al 0.1% (PMC 0.1%).

Aproximadamente 30 mg de hígado fueron homogenizados en cloroformo:metanol (1:1). Se centrifugó a 1000g por 5 min a 4°C y alícuotas del sobrenadante fueron evaporadas. En éstas muestras se determinaron lípidos totales por el método de fosfovainillina (Inouye et al., 2006), triglicéridos y colesterol con reactivos Spinreact. Alícuotas de bilis vesicular diluida se extrajeron con cloroformo:metanol:salina (2:1:0.5). Se centrifugó a 1000g por 5 min y muestras de la fase clorofórmica se evaporaron y analizaron para colesterol, por ensayo enzimático colorimétrico y fosfolípidos por el método de fósforo inorgánico de Bartlett (1959). Otra alícuota de bilis vesicular diluida se analizó para sales biliares totales por método enzimático (Turley, 1978). Se estimó la litogenicidad de la bilis por medio del porcentaje molar de colesterol.

**Tabla 2. Análisis Químico Proximal de dietas de mantenimiento y altas en grasa\***

Dieta	Nutricubos Purina %	Manteca %	Purina-Manteca %
Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25)	25.01	21.26	22.52
Extracto Etéreo	3.73	11.54	10.88
Cenizas	8.04	3.70	7.03
Fibra Cruda	4.56	7.77	3.38
Extracto Libre de Nitrógeno	58.67	55.75	56.19
Total (%)	100	100	100

\* Los resultados se expresan en Base Seca. Método AOAC (Association of Analytical Communities) Químico Proximal (1990). Análisis realizado en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM.

### **Análisis estadístico**

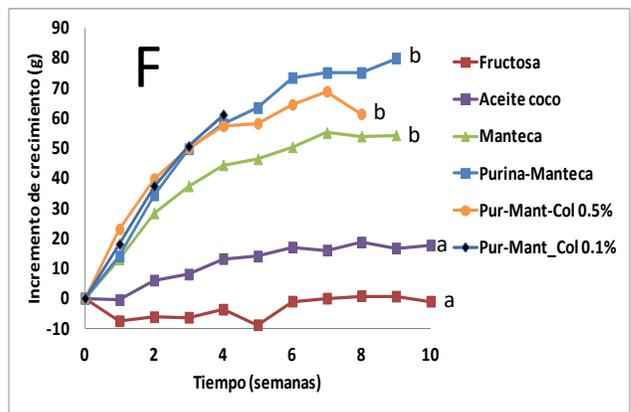
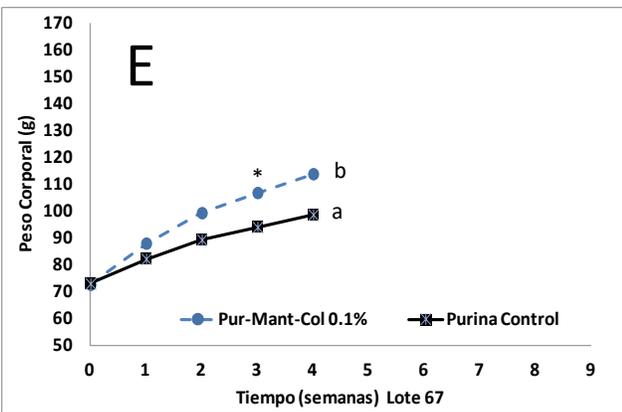
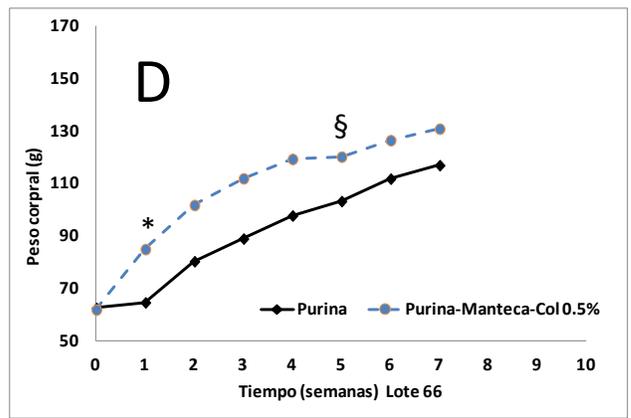
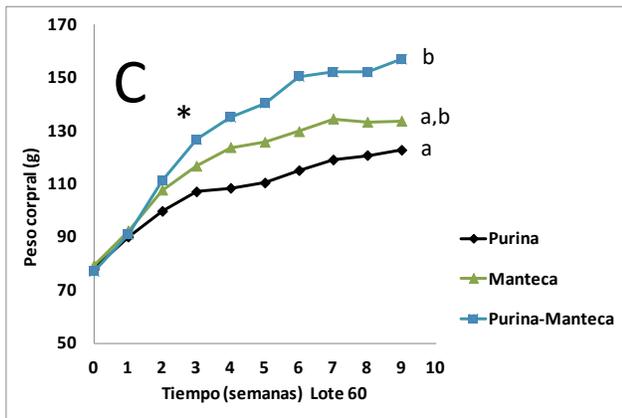
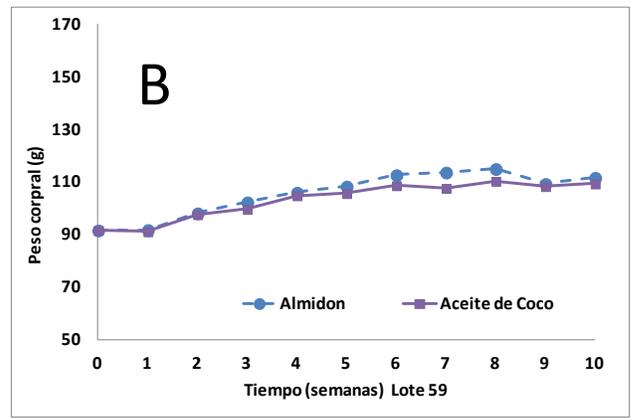
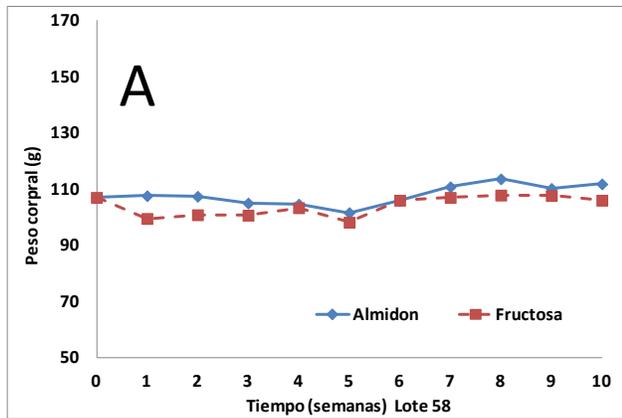
Los resultados son reportados como media  $\pm$  desviación estándar para el número de muestras especificado. Las diferencias entre las muestras fueron analizadas por medio de ANOVA de una vía y prueba pos hoc de Tukey HSD, considerándose significativas las diferencias con una  $p < 0.05$ . Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

## Resultados

### Peso corporal y consumo de alimento

Las curvas de crecimiento a lo largo de 4 a 10 semanas de hámsteres con dietas hipercalóricas de 5 experimentos se presentan en la **Figura 1**. Los grupos con las dietas purificadas con base en fructosa y aceite de coco (Figuras 1A y 1B) no mostraron diferencias significativas de crecimiento respecto a su grupo control con dieta de almidón de maíz. La dieta no purificada con manteca de cerdo indujo en la semana 3 significativamente un mayor peso corporal que la dieta de mantenimiento (Figura 1C), mientras que la dieta purificada de manteca tuvo un crecimiento intermedio que no fue significativamente diferente de las otras 2 dietas. La adición de colesterol al nivel de 0.5% en la dieta no purificada con manteca de cerdo (Figura 1D) tempranamente indujo un aumento significativo del peso corporal desde la primera hasta la cuarta semana; sin embargo, en la semana 5 y de ahí en adelante, el grupo con colesterol ya no fue significativamente mayor al grupo control. Debido a que este nivel de colesterol mostró un hígado hipertrofiado y con esteatosis que dejaba al órgano blanco, se decidió ensayar un nivel de colesterol de solo 0.1% en la dieta no purificada (Figura 1E). Esta dieta causó que desde la tercera semana de suministrada, los hámsteres mostraran un peso corporal significativamente mayor que el grupo control. La Figura 1F muestra el incremento de peso acumulativo semanal de los grupos con dietas hipercalóricas. Se observa que las dietas que inducen el mayor crecimiento significativo con respecto a las dietas de fructosa y aceite de coco, son las que incluyen manteca de cerdo; de éstas, las no purificadas con y sin colesterol indujeron crecimientos similares.

En relación al grado de obesidad alcanzado por los animales, la grasa epididimal fue significativamente mayor en los grupos con dietas no purificadas con manteca de cerdo respecto a los grupos con dietas purificadas. Las dietas purificadas no mostraron diferencias significativas entre sí, e incluso las de almidón y fructosa fueron significativamente menores que la de Purina, solo la que incluía manteca de cerdo alcanzó a inducir un porcentaje de grasa epididimal significativamente mayor al de las de almidón y fructosa.



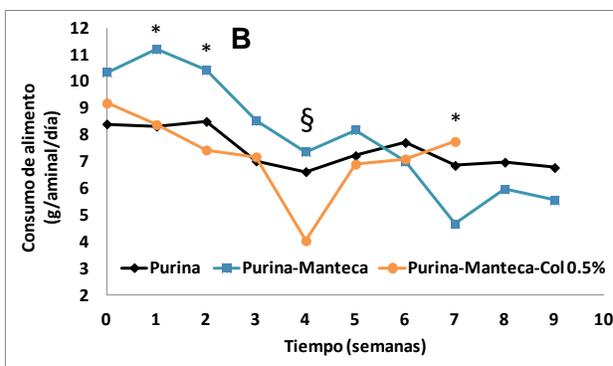
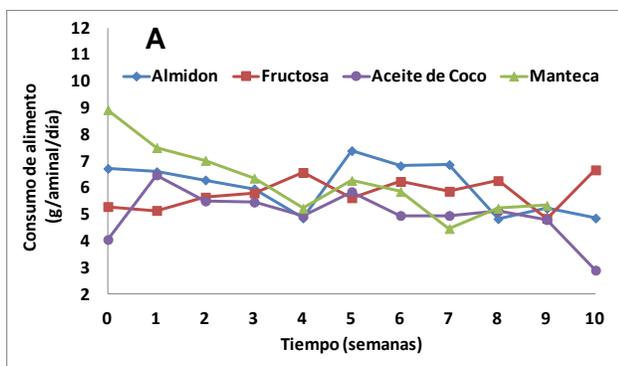
**Figura 1. Peso corporal** de hámsteres con dietas hipercalóricas. \*Semana más temprana en que hubo diferencia significativa en el peso corporal. § Semana a partir de la cual se perdió la diferencia significativa entre grupos. Diferente letra indica diferencia significativa entre grupos. (P<0.05; ANOVA y Tukey).

**Tabla 3. Grasa epididimal en hámsteres con dietas experimentales.\***

Tipo de dieta	Dieta	Grasa Epididimal (g)	% Grasa Epididimal
Purificada	Almidón n = 5	0.97 ± 0.15 <sub>a</sub>	0.86 ± 0.09 <sub>a</sub>
	Fructosa n = 6	0.90 ± 0.18 <sub>a</sub>	0.85 ± 0.11 <sub>a</sub>
	Aceite de Coco n = 6	1.03 ± 0.21 <sub>a</sub>	1.01 ± 0.13 <sub>a,b</sub>
	Manteca n = 6	1.47 ± 0.15 <sub>a,b</sub>	1.10 ± 0.09 <sub>b</sub>
No purificada	Purina n = 6	1.33 ± 0.26 <sub>a,b</sub>	1.08 ± 0.12 <sub>b,d</sub>
	Purina-Manteca n = 6	2.18 ± 0.38 <sub>c</sub>	1.38 ± 0.13 <sub>c</sub>
	Purina-Manteca-Colesterol 0.5% n = 8	1.66 ± 0.23 <sub>b</sub>	1.26 ± 0.07 <sub>c,d</sub>

\*Media ± DS. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05)

Así mismo, el consumo de alimento durante los periodos experimentales con las dietas fue significativamente diferente al inicio (**Figura 2**). Con las dietas purificadas (Fig 2A y Tabla 3), la dieta con manteca de cerdo indujo un mayor consumo al inicio, el cual no fue significativo, que disminuyó progresivamente hasta igualarse con la otras 3 dietas purificadas, las cuales no variaron significativamente entre sí. Con las dietas no purificadas (Fig 2B y Tabla 4), al inicio las dietas con manteca indujeron un mayor consumo, aunque no significativamente diferente al que hubo con Purina, excepto la 1ª y 2ª semana con Purina-Manteca. El consumo disminuyó a lo largo del tiempo y para la 4ª semana no hubo diferencias entre los grupos, excepto un incremento significativo en el grupo con Purina-Manteca-Colesterol 0.5% en la 7ª semana que tuvieron un consumo mayor.



**Figura 2. Consumo de alimento promedio** semanal de hámsteres durante 10 semanas con dietas purificadas (A) y no purificadas (B). \*Semana en que hubo diferencia significativa. § Semana a partir de la cual se perdió la diferencia significativa entre grupos.

**Tabla 4. Consumo de alimento promedio** semanal por animal con dietas purificadas y no purificadas.

Tipo Dieta	Dieta	Consumo de alimento en semana (g / día / hámster)*				
		1 n = 4	4 n = 3	7 n = 3	9 n = 3	10 n = 3
Purificada	Almidón	6.7 ± 1.2 <sub>b,c</sub>	4.9 ± 1.7 <sub>a</sub>	6.9 ± 1.1 <sub>a,b</sub>	5.2 ± 0.9 <sub>a</sub>	4.9 ± 1.9 <sub>a</sub>
	Fructosa	5.3 ± 1.4 <sub>a,c</sub>	6.6 ± 1.0 <sub>a</sub>	5.9 ± 0.7 <sub>a,b</sub>	4.8 ± 1.0 <sub>a</sub>	6.7 ± 1.0 <sub>a</sub>
	Aceite de Coco	4.1 ± 2.9 <sub>c</sub>	4.9 ± 1.8 <sub>a</sub>	5.0 ± 0.5 <sub>a,b</sub>	4.8 ± 0.6 <sub>a</sub>	2.9 ± 2.2 <sub>a</sub>
	Manteca	8.9 ± 1.0 <sub>a,b</sub>	5.2 ± 1.1 <sub>a</sub>	4.5 ± 1.5 <sub>a</sub>	5.3 ± 1.8 <sub>a</sub>	
No purificada	Purina	8.4 ± 1.3 <sub>a,b</sub>	6.6 ± 1.3 <sub>a</sub>	6.9 ± 2.1 <sub>a,b</sub>	6.8 ± 0.5 <sub>a</sub>	
	Purina-Manteca	10.3 ± 1.3 <sub>b</sub>	7.4 ± 1.0 <sub>a</sub>	4.7 ± 1.9 <sub>a</sub>	5.6 ± 1.5 <sub>a</sub>	
	Purina-Manteca-Colesterol 0.5%	9.2 ± 0.8 <sub>b</sub>	4.0 ± 2.6 <sub>a</sub>	7.8 ± 1.9 <sub>b</sub>		
	Purina-Manteca-Colesterol 0.1 %	10.1 ± 0.04 <sub>b</sub>	7.9 ± 0.4 <sub>a</sub>			

\*Media ± DS. Diferente letra indica diferencia significativa entre grupos. (P<0.05).

## Parámetros plasmáticos

Al cabo del periodo en que recibieron las dietas experimentales, la glucosa plasmática en los animales con dietas de almidón y aceite de coco presentaron concentraciones significativamente mayores a las de las demás dietas (**Tabla 5**). En triglicéridos, los animales con dieta pura de manteca exhibieron significativamente los mayores niveles de todos los grupos. En colesterol total el grupo con 0.5% de colesterol en la dieta exhibió la mayor concentración, mientras que los grupos con dietas purificadas, incluyendo el control de dieta de almidón, también presentaron niveles significativamente superiores al grupo con Purina. El grupo con Purina-Manteca no fue significativamente diferente del grupo control con Purina. En cambio, la proporción del colesterol HDL no presentó diferencias significativas.

**Tabla 5. Parámetros plasmáticos** de hámsteres con dietas experimentales.\*

Tipo de dieta	Dieta y periodo experimental	Glucosa (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol total (mg/dl)	% Colesterol HDL (mg/dl)
Purificada	Almidón 10 semanas n = 6	260 ± 58 <sub>b</sub>	300 ± 89 <sub>a</sub>	179 ± 11 <sub>b,d</sub>	42 ± 11 <sub>a,b</sub>
	Fructosa 10 semanas n = 6	137 ± 14 <sub>a</sub>	249 ± 115 <sub>a</sub>	217 ± 23 <sub>d</sub>	49 ± 6 <sub>a,b</sub>
	Aceite de coco 10 semanas n = 6	228 ± 77 <sub>b</sub>	211 ± 74 <sub>a</sub>	193 ± 15 <sub>b,d</sub>	49 ± 26 <sub>a,b</sub>
	Manteca 7 semanas n = 6	152 ± 14 <sub>a</sub>	485 ± 127 <sub>b</sub>	186 ± 49 <sub>b,d</sub>	35 ± 33 <sub>b</sub>
No purificada	Purina 7 semanas n = 6	134 ± 18 <sub>a</sub>	159 ± 36 <sub>a</sub>	96 ± 14 <sub>a</sub>	64 ± 18 <sub>a</sub>
	Purina-Manteca 7 semanas n = 6	190 ± 14 <sub>a,b</sub>	294 ± 70 <sub>a</sub>	136 ± 25 <sub>a,b</sub>	55 ± 8 <sub>a,b</sub>
	Purina-Manteca-Colesterol 0.5% 7 semanas n = 8	155 ± 40 <sub>a</sub>	311 ± 95 <sub>a</sub>	402 ± 53 <sub>c</sub>	49 ± 14 <sub>a,b</sub>

\*Media ± DS. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05; ANOVA y Tukey)

## Tolerancia a insulina

En las curvas de tolerancia a la insulina (**Tabla 6**), tanto la pendiente en mg/dl/min como en porcentaje de disminución de glucosa por minuto, no fue significativamente diferente entre los grupos, debido a una alta dispersión de los datos. Solo con dieta de Purina con manteca el % de reducción de glucosa por minuto fue menor que el de los grupos que recibieron dietas purificadas y Purina, indicando mayor resistencia a la acción de la insulina en este grupo.

**Tabla 6. Tolerancia a insulina** de hámsteres con dietas experimentales.\*

Tipo de dieta	Dieta	Reducción de glucosa (mg/dl/min)	Reducción de glucosa (%/min)
Purificada	Almidón n = 6	8.2 ± 3.2 <sub>c</sub>	3.8 ± 1.0 <sub>b</sub>
	Fructosa n = 6	6.0 ± 0.6 <sub>a,c</sub>	4.0 ± 0.7 <sub>b</sub>
	Aceite de Coco n = 6	4.6 ± 2.3 <sub>a,b,c</sub>	3.0 ± 1.9 <sub>a,b</sub>
	Manteca n = 5	4.3 ± 0.8 <sub>a,b</sub>	2.5 ± 0.7 <sub>a,b,c</sub>
No purificada	Purina n = 6	4.3 ± 2.3 <sub>a,b</sub>	3.2 ± 1.3 <sub>a,b</sub>
	Purina-Manteca n = 6	1.5 ± 2.0 <sub>b</sub>	0.7 ± 1.0 <sub>c</sub>
	Purina-Manteca-Colesterol 0.5% n = 8	3.0 ± 1.8 <sub>a,b</sub>	1.5 ± 1.0 <sub>a,c</sub>

\* Media ± DS. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05)

### Parámetros hepáticos

Después del periodo experimental, (**Tabla 7**) tanto el peso del hígado absoluto como porcentual de los tres grupos con manteca de cerdo fueron significativamente mayores que los de los demás grupos. Los grupos con Purina y con aceite de coco fueron los de significativamente menor peso del hígado.

Respecto a los lípidos hepáticos (**Tabla 7**), el grupo con dieta de Purina-manteca y colesterol exhibió significativamente la mayor concentración de lípidos totales, colesterol y triglicéridos, aunque estos dos últimos no alcanzaron a ser significativamente más elevados.

**Tabla 7. Parámetros hepáticos de hámsteres con dietas experimentales.\***

Tipo de dieta	Grupos y Dieta	Hígado (g)	Hígado (% p.c.)	Lípidos tot. (mg/g)	Triglicéridos (mg/g)	Colesterol (mg/g)
Purificada	Almidón n = 5	6.5 ± 0.5 <sub>a</sub>	5.8 ± 0.2 <sub>b,c</sub>	25 ± 6 <sub>a</sub>	9.8 ± 3.1 <sub>a</sub>	3.6 ± 1.2 <sub>b,c</sub>
	Fructosa n = 6	6.4 ± 0.9 <sub>a</sub>	6.1 ± 0.5 <sub>c</sub>	47 ± 11 <sub>a</sub>	8.8 ± 2.8 <sub>a</sub>	6.9 ± 1.7 <sub>a,b</sub>
	Aceite de Coco n = 4	4.1 ± 0.3 <sub>c</sub>	4.0 ± 0.1 <sub>a</sub>	ND	ND	ND
	Manteca n = 6	8.2 ± 0.5 <sub>b</sub>	6.2 ± 0.1 <sub>c</sub>	41 ± 4 <sub>a</sub>	12.4 ± 8.3 <sub>a</sub>	4.3 ± 3.5 <sub>a,b</sub>
No purificada	Purina n = 6	5.2 ± 0.8 <sub>a,c</sub>	4.3 ± 0.5 <sub>a</sub>	34 ± 8 <sub>a</sub>	6.9 ± 3.5 <sub>a</sub>	5.0 ± 4.1 <sub>a,b,c</sub>
	Purina-Manteca n = 6	8.3 ± 0.5 <sub>b</sub>	5.3 ± 0.2 <sub>b</sub>	39 ± 5 <sub>a</sub>	11.1 ± 8.6 <sub>a</sub>	1.8 ± 1.1 <sub>c</sub>
	Purina-Manteca-Colesterol 0.5% n = 8	9.2 ± 1.2 <sub>b</sub>	6.9 ± 0.3 <sub>d</sub>	223 ± 31 <sub>b</sub>	15.6 ± 3.4 <sub>a</sub>	7.8 ± 0.9 <sub>a</sub>

\* Media ± DS. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05)

### Parámetros biliares

Los valores de los lípidos biliares se muestran en la **Tabla 8**. Hay pocos datos en los grupos con dietas purificadas, debido a que no se pudo colectar la bilis vesicular en todos los animales, por presentar vesículas vacías o porque se rompió la vesícula al disecarla. En fosfolípidos hubo mayor concentración en los animales con dietas de Purina, Purina con manteca y Purina-manteca con colesterol, es decir con las dietas no purificadas y en particular con la que se adicionó de colesterol. En ácidos biliares no hubo diferencias entre los grupos. El colesterol biliar fue más elevado en el grupo con dieta Purina-manteca y colesterol, seguido de los grupos con las dietas purificadas de almidón, fructosa y manteca. Las concentraciones más bajas de colesterol biliar se encontraron en los grupos con dieta no purificada sin adición de colesterol. Se observó un mayor porcentaje molar de colesterol con las dietas purificadas, en particular las de fructosa y manteca, y con la no purificada adicionada de colesterol. En los animales con dieta purificada de manteca se presentaron cálculos biliares en 4 de 5 animales, pero fueron de tipo pigmentario, no de colesterol.

**Tabla 8. Composición de la bilis vesicular de hámsteres con dietas experimentales.\***

Tipo de dieta	Dieta	Fosfolípidos mM	Ácidos biliares mM	Colesterol mM	% Molar Colesterol
Purificada	Almidón n = 3	2.5 ± 0.3 <sub>a</sub>	25.5 ± 2.4 <sub>a</sub>	0.71 ± 0.10 <sub>a,b</sub>	2.5 ± 0.2 <sub>a,b</sub>
	Fructosa n = 4	2.2 ± 0.4 <sub>a</sub>	20.2 ± 8.3 <sub>a</sub>	1.05 ± 0.13 <sub>b</sub>	5.0 ± 2.1 <sub>b</sub>
	Manteca n = 2	2.5 ± 0.9 <sub>a</sub>	17.5 ± 15.8 <sub>a</sub>	0.67 ± 0.16 <sub>a,b</sub>	4.7 ± 4.1 <sub>a,b</sub>
No purificada	Purina n = 6	5.0 ± 2.6 <sub>a,b</sub>	18.7 ± 5.0 <sub>a</sub>	0.34 ± 0.04 <sub>a</sub>	1.5 ± 0.2 <sub>a</sub>
	Purina-Manteca N = 5	7.5 ± 1.9 <sub>b</sub>	17.6 ± 2.5 <sub>a</sub>	0.31 ± 0.05 <sub>a</sub>	1.3 ± 0.3 <sub>a</sub>
	Purina-Manteca-Colesterol 0.5% n = 7	11.3 ± 1.3 <sub>c</sub>	20.1 ± 5.8 <sub>a</sub>	1.53 ± 0.50 <sub>c</sub>	4.3 ± 1.1 <sub>b</sub>

\*Media ± DS. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

## Discusión y conclusiones

La comparación de los resultados entre las dietas purificadas muestra que la dieta de manteca es la que induce mejor algunos parámetros del SM en el hámster, sin embargo solo el peso del hígado y triglicéridos plasmáticos fueron significativos con respecto a los de animales con dieta de almidón. En los otros parámetros solo hubo una tendencia a ser más elevados. La fructosa y el aceite de coco no causaron una mayor obesidad y varios parámetros plasmáticos y hepáticos no llegaron a ser diferentes a los de la dieta control basada en almidón. La manteca de cerdo, al ser grasa de origen animal, es la que mejor produce incremento en parámetros del síndrome metabólico, a diferencia de la grasa de origen vegetal como el aceite de coco.

La dieta con 10% de aceite de coco no incrementó el peso corporal de los hámsteres como se esperaba. El aceite de coco fue elegido como grasa saturada experimental porque ha sido utilizado previamente en estudios con hámsteres alimentados con dietas altas en aceite de coco y colesterol durante 12 semanas, que les produjeron mayor concentración de colesterol total y triglicéridos, aumento en el peso del hígado y del colesterol hepático, en comparación con hámsteres alimentados con dieta con aceite de coco, sin colesterol, que tuvieron reducciones en esos parámetros (Lecker et al., 2010). En nuestro trabajo el aceite de coco no afectó los parámetros plasmáticos, pero indujo un menor peso del hígado que la dieta con almidón.

Dieta con fructosa fue empleada por Kasim-Karakas et al. (1996) encontrando que la dieta purificada con 60% de fructosa por 2 semanas indujo un pequeño pero significativo incremento en peso corporal, menor tolerancia a la glucosa, incremento de triglicéridos plasmáticos y hepáticos. En nuestra

experiencia la fructosa no incremento el peso corporal u obesidad de los animales, ni los parámetros plasmáticos ni hepáticos se alteraron significativamente. Quizás la cepa y talla de los hámsteres utilizados puede ser la diferencia con nuestro estudio, ya que eran hámsteres más grandes al inicio. Lo que sorprende es el consumo de alimento reportado por ellos, que fue más de 4 veces mayor que el encontrado por nosotros, e inclusive es mayor al consumo de una rata de 300 g de peso corporal.

En general, no se obtuvieron los cambios esperados con las dietas purificadas, excepto parcialmente con la dieta de manteca de cerdo, la cual produjo cálculos biliares pero del tipo pigmentarios y no de colesterol, que se asocian más con el síndrome metabólico. En el hámster este tipo de cálculos están compuestos principalmente de hidroxapatita y sales de calcio de ácidos biliares (Dam, 1969). Por lo anterior, se ensayó la dieta no purificada con manteca de cerdo. Esta dieta tuvo una mayor aceptación por los animales, mostrada por un mayor consumo al inicio del experimento, quizás por la textura o palatabilidad. La dieta no purificada con manteca indujo una mayor obesidad, expresada como mayor peso corporal y contenido de grasa epididimal, así como resistencia a la insulina, medida como la pendiente de la curva de tolerancia a la insulina, además de una tendencia a mayor acumulación de grasa en plasma e hígado.

Sin embargo, con la dieta no purificada con manteca, el colesterol plasmático no se encontró significativamente alto, e inclusive fue menor que con dietas purificadas. Así mismo, el colesterol biliar fue igualmente bajo. Por lo anterior, se decidió ensayar la adición de colesterol a la dieta no purificada de manteca. Un estudio previo mostró que en hámsteres alimentados con dietas de manteca de cerdo adicionada de colesterol al 0.3 a 0.9%, producen mayor incremento de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol hepático y en tejido adiposo, que con la dieta sin adición de colesterol. En este mismo trabajo se encontró que en la rata no se elevó la concentración triglicéridos ni colesterol séricos como en el hámster, y que estos últimos responden de modo directamente proporcional a la concentración de colesterol agregado a la dieta (Zhang et al., 2009b). En nuestro estudio con la adición de colesterol al 0.5% en la dieta se produjo hepatomegalia y mayor contenido de lípidos totales, así como una tendencia al incremento de colesterol y triglicéridos plasmáticos y hepáticos en comparación con la dieta no purificada de Purina y de Purina-manteca. Con esta dieta la apariencia del hígado fue el de una marcada esteatosis, por la hepatomegalia pronunciada y el color blanco del hígado, la cantidad de colesterol parece ya tener efectos tóxicos a las 7 semanas, pues el crecimiento de los animales se redujo. Por lo cual se decidió ensayar la dieta no purificada con manteca adicionada de solo el 0.1% de colesterol, con la cual a las 2 semanas de suministro los animales ya presentaban un peso corporal significativamente mayor que con solo la dieta de mantenimiento. Esta última dieta es la que se utilizó para evaluar el efecto del extracto etanólico de Gobernadora, por afectar menos el hígado e inducir dislipidemia, como se discutirá en el siguiente capítulo.

Respecto a los parámetros biliares, las dietas purificadas, particularmente fructosa y manteca, indujeron un mayor porcentaje de colesterol biliar, debido a una mayor concentración de colesterol biliar y una reducción en los fosfolípidos. Entre las dietas no purificadas, la adición de colesterol incrementó el colesterol biliar más que con ninguna otra dieta, pero también se estimuló una mayor secreción de fosfolípidos por lo que el porcentaje molar de colesterol, aunque elevado, no fue mayor que con las

dietas purificadas de fructosa y manteca. Entre las dietas no purificadas, la adición de colesterol sí produjo una mayor litogenicidad que la de Purina y Purina-manteca, lo que permitiría estudiar el efecto de diferentes compuestos sobre la litogenicidad de la bilis. La dieta litogénica para hámsteres descrita por Dam (1969) es sin grasas y alta en carbohidratos refinados, como glucosa o sacarosa. La deficiencia en ácidos grasos en los animales provoca una mayor síntesis de colesterol en el organismo y su excreción en la bilis provoca la litiasis. Al añadir menos de 2% de aceite vegetal a la dieta de Dam, previene la formación de los cálculos de colesterol. También es posible que el colesterol de la dieta se depositó en la abundante grasa corporal, en vez de eliminarse en la bilis.

## **Etapa II. Efecto de Gobernadora y NDGA en el modelo de hámster alimentado con una dieta alta en manteca de cerdo**

### **Antecedentes.**

Se ha publicado que el masoprocol, que es NDGA puro extraído de la Gobernadora, reduce las concentraciones de glucosa plasmática y triglicéridos en ratas diabéticas tratadas con estreptozotocina, (Luo et al., 1998, Reed et al., 1999). También en un modelo de ratas no diabéticas con hipertrigliceridemia inducida por fructosa en su dieta, el masoprocol redujo las concentraciones de triglicéridos plasmáticos (Scribner et al., 2000) e inhibe la dipeptidil peptidasa 4, la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa (Roskar et al., 2016). Por otro lado, el extracto etanólico de Gobernadora redujo la incidencia de cálculos biliares de colesterol en hámsteres con dieta litogénica alta en glucosa y sin grasas, al incrementar el quenodesoxicolato y reducir el desoxicolato biliar, cambios que favorecen una bilis menos saturada de colesterol, lo que redujo el porcentaje molar de colesterol (Arteaga et al., 2005b). En ratones con dieta alta en grasa como manteca de cerdo, el NDGA, administrado oralmente, redujo la ganancia de peso corporal, la grasa epididimal y subcutánea, el colesterol total, LDL y los triglicéridos séricos, además en el hígado previene la esteatosis y reduce los triglicéridos. Los animales mostraron baja expresión de la proteína de unión al elemento regulador del estero1-1 (SREBP-1, por sus siglas en inglés) en el hígado, factor de transcripción que participa aumentando la lipogénesis, y también se observó un aumento en la expresión del receptor alfa activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR- $\alpha$ ), involucrado en la oxidación de ácidos grasos (Lee et al., 2010). En ratas con dieta alta en fructosa, la administración oral de NDGA redujo los niveles plasmáticos de triglicéridos, glucosa, insulina y ácidos grasos libres, también redujo en el hígado los triglicéridos (Zhang et al., 2015). Muchas de las actividades farmacológicas de los extractos de Gobernadora se han adscrito a sus lignanos, aunque hay muchos otros componentes que pueden actuar sinérgicamente o potenciando sus actividades (Arteaga et al., 2005a, Gnabre et al., 2015).

El extracto etanólico de Gobernadora tiene actividad antimicrobiana (Mabry y Bohnstedt, 1981; Verástegui et al., 1996), lo cual puede afectar la microbiota intestinal del hámster. La microbiota intestinal puede afectar el metabolismo del organismo, además de la absorción de nutrientes (Di Baise et al., 2012; Festi et al., 2014). Por otro lado, en hámsteres, esteroides de plantas reducen la absorción de colesterol e incrementan su excreción fecal (Rasmussen et al., 2006).

Tanto alteraciones en la microbiota como algún componente del extracto de Gobernadora podrían estar evitando la absorción de colesterol proveniente de la dieta, y eliminándolo por las heces, actuando de manera análoga a la Ezetimiba. Esta última es un fármaco que en humanos que se emplea para reducir el colesterol plasmático hasta en 15 a 20%. El blanco directo es el transportador intestinal de esteroides, la proteína Niemann-Pick C1-like (NPC1L1), la cual es crítica en el transporte transmembranal de colesterol en el intestino delgado. La Ezetimiba se une a su dominio extracelular y bloquea la absorción de esteroides (Valasek et al., 2008; Suchy et al., 2011) aumentando su excreción fecal.

## **Justificación**

La prevalencia del SM en adultos, de acuerdo a los criterios de la IDF es de casi el 50% en México (Rojas et al., 2010). Las causas que llevan a esta elevada frecuencia son el sedentarismo, consumo excesivo de alimentos y dieta rica en carbohidratos refinados y/o grasas, así como malos hábitos alimentarios, lo que ha provocado una epidemia de obesidad y SM. El tratamiento adecuado de cada componente del síndrome puede prevenir o retardar la aparición de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares, dos de las principales causas de mortalidad en población adulta en México (Rojas et al., 2010).

Debido a que el SM es un grupo de anormalidades metabólicas caracterizado recientemente, es difícil encontrar en la medicina tradicional mexicana plantas utilizadas específicamente para su tratamiento. Sin embargo, la Gobernadora se utiliza en el tratamiento de la diabetes, (Winkelman, 1989), por lo que podría también tener efecto sobre el SM que frecuentemente antecede a la diabetes.

## **Objetivo general**

Establecer el efecto de Gobernadora sobre parámetros del SM, empleando como modelo al hámster alimentado con una dieta hipercalórica alta en grasa y colesterol.

## **Objetivos particulares**

Determinar el efecto del extracto alcohólico de hojas y tallos de Gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre los siguientes parámetros de hámsteres alimentados con una dieta alta en manteca de cerdo adicionada de colesterol:

- Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina y leptina.
- La resistencia a la insulina.
- La acumulación de lípidos totales, triglicéridos y colesterol por el hígado.
- El estrés oxidativo y peroxidación en el hígado.
- La composición lipídica y litogenicidad de la bilis.

Así mismo, puesto que el cambio en el estilo de vida, principalmente en la dieta y en el ejercicio, son recomendados para el tratamiento del SM en humanos (Grundy et al., 2004b), se ensayó el efecto del

cambio de dieta grasa a dieta de mantenimiento con o sin el extracto de Gobernadora. Se espera que el cambio de dieta más el extracto pueda inducir mayor beneficio en revertir los parámetros alterados.

Se compararán los efectos de Ezetimiba, como control positivo de la inhibición de la absorción del colesterol dietético, y el extracto de Gobernadora para determinar si el extracto tiene un efecto sobre la excreción fecal de colesterol.

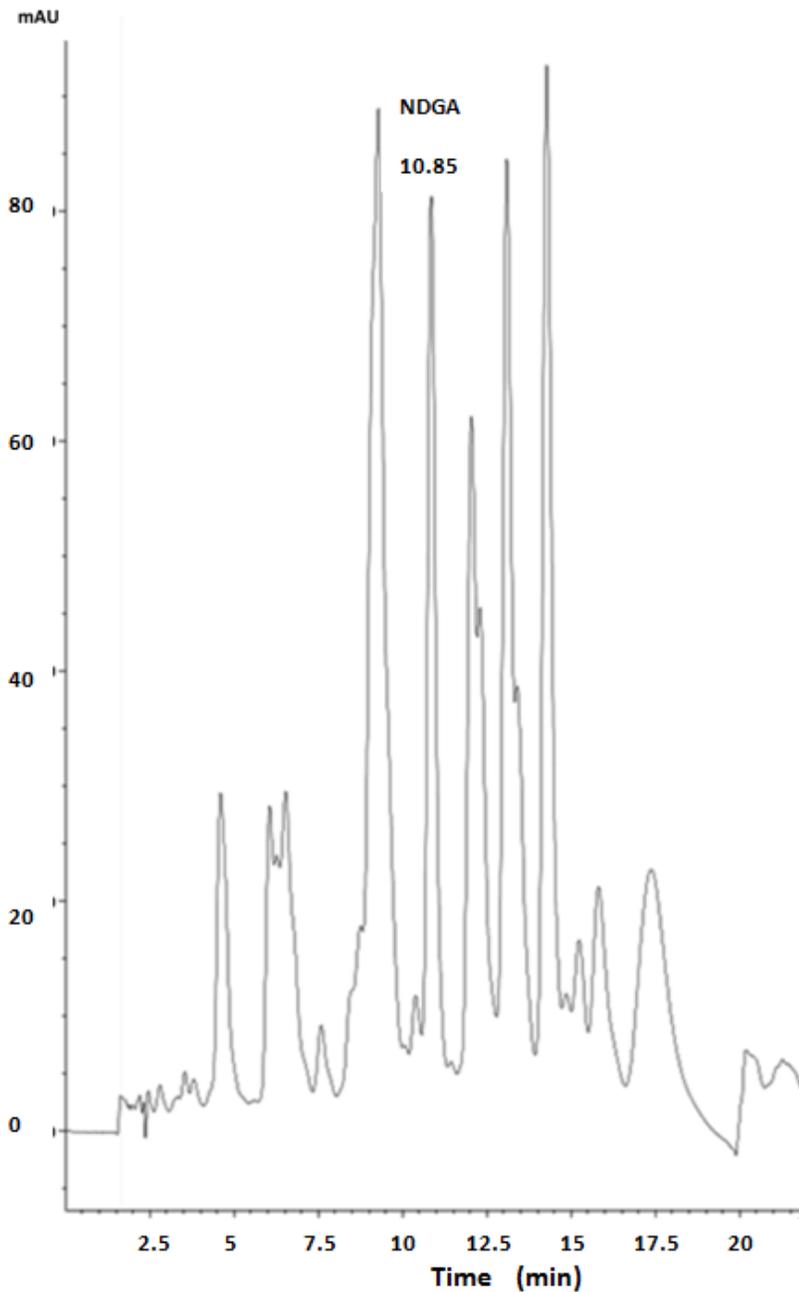
## **Método:**

### **Preparación del extracto etanólico de Gobernadora**

La planta utilizada para obtener el extracto etanólico de Gobernadora fue colectado en San Luis Potosí. Especímenes se depositaron en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM (MEXU; no. 534807) y en el Herbario de Plantas Medicinales, Centro Médico Siglo XXI (IMSS; nos. 11 319-11 321). A 100 g de hojas y talluelos de planta seca se les agregaron 1L de etanol absoluto y se agitó durante 30min a temperatura ambiente. Se filtró y se evaporó el etanol en un rotavapor. La resina obtenida se liofilizó y las hojuelas y polvo resultantes se almacenaron en envase de aluminio y en desecación. Se tuvo un rendimiento de aproximadamente 11g de resina por 100g de planta.

### **Contenido de NDGA en el extracto etanólico de Gobernadora**

Se utilizó un equipo de HPLC marca Agilent 1260 infinity, equipado con un detector de diodos G1315C, con una columna de fase inversa C-18 (250 x 4.6 mm; 100-5) Macherey-Nagel. Como fase móvil se empleó  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.04 M y acetonitrilo (ACN); se inició con una relación de  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$  70:30 (v/v) y se incrementó la concentración de ACN hasta llegar a una relación de  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$  50:50 (v/v) a los 15 minutos. Posteriormente se aumentó nuevamente la concentración de ACN hasta llegar a una relación  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ACN}$  30:70 (v/v) en el minuto 19. Finalmente se estabilizó nuevamente a 30% de ACN en el minuto 21. El flujo utilizado fue de 1.5 mL/min y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra. Se detectó a 280 nm. Se hizo una curva estándar de NDGA en el intervalo de 20 a 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de metanol. Como se muestra en el cromatograma del extracto de Gobernadora (**Figura 1**), muestra un pico a los 10.85 min de corrida que corresponde a NDGA, junto con otros picos, que podrían ser derivados O-metilados reportados para la resina (Gnabre et al., 2015). La concentración del ácido nordihidroguayarático se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en la ecuación de la recta, obtenida a partir de las curva de calibración diseñada en la evaluación de la linealidad del sistema. En base a la curva patrón realizada, el extracto etanólico contiene 8.9% de NDGA. La evaluación de la selectividad del método se realizó mediante el registro de los espectros de UV del estándar de NDGA (Sigma Aldrich), la matriz de trabajo (extracto de Gobernadora) y la matriz enriquecida con el estándar. La validación del método analítico se realizó con base en los lineamientos establecidos por guías de validación ICH [Q2 (R1), 2005].



**Figura 1. Cromatograma del extracto etanólico de Gobernadora** (mAU: Unidades de Absorbancia, es directamente proporcional a la concentración del compuesto en la muestra).

### **Animales y dietas**

Se utilizó la dieta alta en grasa, que consistió de la dieta de mantenimiento para roedores (Nutricubos Purina) adicionada de 20% (p/p) de manteca de cerdo y otros componentes para no desbalancearla nutricionalmente, adicionada de 0.1% de colesterol (PMC 0.1%; Tabla 1). Los hámsteres se

mantuvieron en jaulas de acero inoxidable con cama de aserrín y recibieron las dietas y agua corriente ad libitum. Los animales fueron pesados semanalmente y se determinó el consumo de alimento suministrando una cantidad determinada y midiendo el restante cada tercer día. Se colectaron las heces de 3 días de cada grupo en la última semana de tratamiento.

Se formaron 7 grupos de 6 hámsteres machos de 5 semanas de edad y un peso promedio inicial de 75g. Los animales de cada grupo se mantuvieron en una sola jaula, porque se observó que crecen mejor con la interacción social que al mantenerse en jaulas individuales. Un grupo recibió solo Nutricubos Purina por 4 semanas, los otros seis grupos recibieron PMC 0.1% durante las primeras 2 semanas. En las siguientes 2 semanas, uno de los 6 grupos continuo recibiendo la dieta PMC 0.1%, otro recibió la dieta grasa adicionada de extracto de Gobernadora al nivel de 0.2 % y otro la dieta grasa adicionada de 3mg% de Ezetimiba (Zient, Schering-Plough) como control positivo de la inhibición de la absorción del colesterol dietético (Suchy et al., 2011). Los 3 grupos restantes cambiaron a una de las siguientes dietas: Nutricubos Purina únicamente o éstos adicionados con 0.2% de extracto de Gobernadora o con 3mg% de Ezetimiba. Considerando un consumo de alimento de 7g/día para un hámster de 100g, las dosis serían de 140mg/kg p.c. y 2.1mg/kg p.c. de extracto de Gobernadora y Ezetimiba, respectivamente.

Al término de las 4 semanas del periodo experimental, los animales, en ayuno de 4 horas, fueron anestesiados con pentobarbital (63mg/kg p.c.). Se tomaron muestras de sangre por el seno retroorbital con capilares heparinizados y no heparinizados. Los capilares fueron sellados por calor y centrifugados en una centrifuga para microhematocritos Microspin 24 (Vulcon Technologies). El plasma y el suero se separaron y se almacenaron a 4 y -40°C, respectivamente. En el plasma, se analizaron los metabolitos en los siguientes 3 días y en el suero se analizaron insulina y leptina. Posteriormente, a los hámsteres aún bajo anestesia se les realizó una prueba de tolerancia a insulina, por inyección intraperitoneal de insulina (Humulin R, Lilly) a dosis de 0.2 UI/ 100g p.c. en 0.1ml de PBS, y se determinó glucosa en plasma de muestras de sangre tomadas con capilares heparinizados a los 5, 10 y 15 min después de la inyección.

Después de la prueba de tolerancia a insulina, los animales fueron sacrificados por exceso de anestesia, se disecó el hígado y la vesícula biliar, colectándose la bilis vesicular, determinando su volumen gravimétricamente. El hígado y la bilis se mantuvieron en congelación a -40°C.

### **Análisis de muestras**

En plasma se determinó glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL por ensayos enzimáticos colorimétricos (SpinReact, Girona, España).

En suero se determinaron las concentraciones de insulina y leptina por medio de ELISA de tipo sandwich (Millipore Rat/Mouse Insulin y Millipore Rat Leptin).

En hígado se determinó la concentración de lípidos totales por medio de reactivo de vainillina, triglicéridos y colesterol por ensayos enzimáticos colorimétricos.

El estrés oxidativo en el hígado se determinó con la prueba del ácido tiobarbitúrico para detectar peroxidación de lípidos (Ohkawa et al., 1979) de la siguiente manera: 10% de hígado fue homogenizado en NaCl al 0.9%, centrifugado a 800g, 10 minutos a 4°C. Alícuotas de 0.1 ml del sobrenadante fueron mezcladas con 50µl de SDS al 8.1%, 60µl de BHT 50mM en metanol, 375µl ácido acético al 20% pH 3.5, 375µl ácido tiobarbitúrico al 0.8%, y 40µl de agua desionizada. La mezcla se incubó en baño maría a 95°C durante 60 minutos, se enfrió y se agregaron 250µl de agua y 1.2ml de butanol. Se agitó y se centrifugó a 1000g por 10 min. La absorbancia se leyó a 532 nm en la fase orgánica.

La capacidad antioxidante del hígado se ensayó por medio de método del 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Hsu et al, 2007; Sharma et al, 2009) de la siguiente manera: a una alícuota de 50µl del mismo homogenado de la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se le agregaron 350 µl de metanol, seguido por 400µl de DPPH a 0.8mg% en metanol, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente, centrifugando 12000g durante 3 minutos antes de leer la absorbancia a 517 nm.

Una alícuota del hígado fue homogenizada en cloroformo:metanol (1:1). Se centrifugó a 1000g por 5 min a 4°C y alícuotas del sobrenadante fueron evaporadas. En éstas muestras se determinaron los lípidos totales por el método de fosfovainillina (Inouye et al., 2006), triglicéridos y colesterol con reactivos Spinreact.

Alícuotas de bilis vesicular diluida se extrajeron con cloroformo:metanol:salina (2:1:0.5). Se centrifugó a 1000g por 5 min y muestras de la fase clorofórmica se evaporaron y analizaron para colesterol, por ensayo enzimático colorimétrico y fosfolípidos por el método de fósforo inorgánico de Bartlett (1959). Otra alícuota de bilis vesicular diluida se analizó para sales biliares totales por método enzimático (Turley, 1978). Se estimó la litogenicidad de la bilis por medio del porcentaje molar de colesterol.

En bilis vesicular se analizaron sales biliares por el método enzimático (Turley y Dietschy, 1978), colesterol por ensayo enzimático colorimétrico y fosfolípidos por el método de fósforo inorgánico de Bartlett (Bartlett, 1959). Se estimó la litogenicidad de la bilis por medio del porcentaje molar de colesterol.

Los esteroides fecales neutros se extrajeron por medio de cloroformo:metanol:salina (2:1:0.75) de muestras de heces de 72 horas recogidas al final de la segunda semana de tratamientos. Se determinaron esteroides en la fase orgánica por medio de la reacción de Lieberman-Burchard (Richterich and Colombo, 1981).

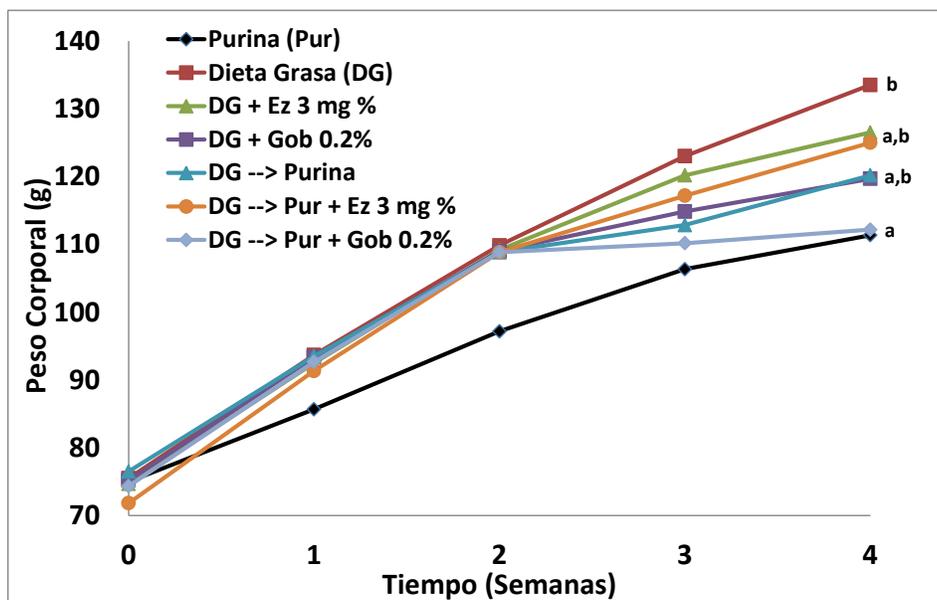
### **Análisis estadístico**

Los resultados son reportados como media  $\pm$  desviación estándar para el número de muestras especificado. Las diferencias entre las muestras fueron analizadas por medio de ANOVA de una vía con significancia estadística de  $p < 0.05$ . Tukey HSD fue la prueba pos hoc. Los análisis estadísticos fueron realizados con GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

## Resultados

### Peso corporal y consumo de alimento

El peso corporal a las 2 semanas no presentó diferencias significativas entre los grupos (**Figura 1**). En la cuarta semana, el grupo con dieta grasa control tuvo el mayor peso corporal de todos los grupos, el cual fue solo significativamente mayor contra el de los grupos con Purina sola y el que cambio de dieta grasa a Purina con extracto de Gobernadora ( $P < 0.05$ ), los cuales presentaron un peso similar y el menor peso de todos los grupos. Los 2 grupos con Ezetimiba fueron los segundos en mayor peso, y en tercer lugar el de DG con Gobernadora y el que cambio a Purina sola. El peso de ninguno de estos 4 últimos grupos fue significativamente diferente del de DG ni del de Purina control.



**Figura 1. Curvas de crecimiento** de hámsteres con dietas no purificadas y extracto de Gobernadora en la dieta durante las últimas 2 semanas. En la cuarta semana, diferente letra indica diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.05$ ).

En relación a la grasa epididimal (**Tabla 3**), ésta aumentó significativamente con la DG sola respecto a Purina y DG con Gobernadora y no presentó diferencias con los que recibieron DG o Purina con Ezetimiba, incluso al cambiar de dieta grasa a Purina la grasa epididimal disminuyó, pero no alcanzó a ser significativamente diferente del grupo con DG. Con dieta grasa y extracto de Gobernadora este parámetro disminuyó significativamente respecto al grupo con DG, mientras que el cambio de DG a Purina con extracto de Gobernadora tuvo la menor masa de grasa epididimal, también diferente de DG sola. Se encontró una alta correlación entre el peso corporal y el peso de la grasa epididimal ( $r = 0.8$ ,  $n = 42$ ,  $P < 0.001$ ). En relación al peso porcentual de la grasa epididimal, los grupos que recibieron extracto presentaron los valores más bajos, pero solo el que recibió el extracto de Gobernadora con Purina

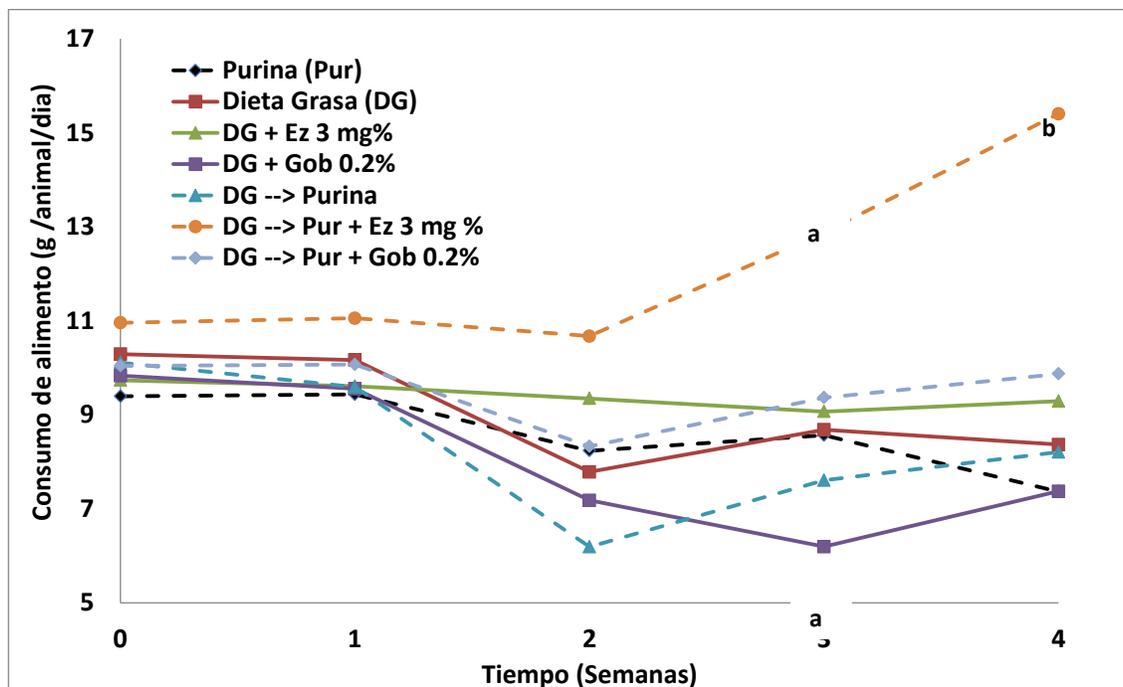
alcanzó a ser significativamente diferente de todos los demás grupos, excepto con el que recibió DG y extracto.

**Tabla 3. Grasa epididimal. \***

Grupos y Dietas	Grasa Epididimal (g)	% Grasa Epididimal
Purina n = 6	1.43 ± 0.29 <sub>a,c</sub>	1.28 ± 0.19 <sub>a</sub>
Dieta grasa (DG) n = 6	1.90 ± 0.28 <sub>b</sub>	1.42 ± 0.17 <sub>a</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 6	1.88 ± 0.25 <sub>a,b</sub>	1.45 ± 0.16 <sub>a</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 6	1.43 ± 0.18 <sub>a,c</sub>	1.19 ± 0.08 <sub>a,b</sub>
Dieta grasa ---> Purina n = 6	1.50 ± 0.18 <sub>a,b,c</sub>	1.24 ± 0.11 <sub>a</sub>
DG --> Purina + Ezetimiba 3mg% n = 6	1.67 ± 0.35 <sub>a,b</sub>	1.33 ± 0.16 <sub>a</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 6	1.06 ± 0.22 <sub>c</sub>	0.94 ± 0.13 <sub>b</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

En el consumo de alimento (**Figura 2**), hubo diferencias significativas entre los grupos. En la tercera semana, primera con tratamientos, el grupo con Purina y con 3mg% de Ezetimiba presentó un consumo significativamente elevado respecto a todos los demás grupos. Mientras que el menor consumo, significativo contra todos los demás, lo tuvo el grupo con DG y Gobernadora. En la cuarta semana, el grupo con Purina y Ezetimiba mostró un consumo de alimento significativamente mayor al del resto de los grupos. Entre los demás grupos no hubo diferencia.



**Figura 2. Consumo de alimento promedio** de hámsteres con dietas no purificadas. <sup>a</sup> El menor y el mayor valor fueron diferentes de los intermedios. <sup>b</sup> Solo el mayor valor difirió estadísticamente de todos los demás ( $P < 0.05$ ).

### Parámetros plasmáticos

Al final del periodo de tratamiento con las dietas experimentales hubo diferencias significativas en los parámetros plasmáticos analizados entre los grupos con Purina, DG y DG con EZ o extracto de Gobernadora (**Tabla 4**). En glucosa, de los grupos que cambiaron a dieta de Purina hubo tendencia a la reducción en los grupos con EZ o extracto de Gobernadora, respecto a su control que solamente cambio de DG a Purina, sin embargo, estos grupos si presentaron diferencias significativas respecto a los grupos que recibieron Purina y DG por 4 semanas. En triglicéridos, aunque el grupo con DG presentó una mayor concentración, ésta no alcanzó a ser significativa contra el grupo que recibió Purina. La adición de Ezetimiba y extracto a la DG significativamente redujo los triglicéridos respecto a los demás grupos. Al cambiar los animales de DG a la dieta de Purina, no se observaron diferencias significativas contra sus controles.

En colesterol total, el grupo con DG mostró un valor significativamente mayor que el grupo con Purina. La adición de Ezetimiba a la DG indujo valores más bajos que con DG y con solo Purina, lo mismo ocurrió con la adición del extracto de Gobernadora, aunque en menor grado que con Ezetimiba ( $P < 0.05$ ). El cambio de dieta grasa a dieta de Purina redujo el colesterol total a concentraciones similares a las del grupo con Purina por 4 semanas. Con la adición de Gobernadora a la Purina se redujo aún más este parámetro comparado con los grupos que cambiaron de dieta grasa a dieta de Purina y Purina con Ezetimiba, mientras que con la Ezetimiba aunque la concentración disminuyó, no fue significativa contra el grupo que cambio a Purina, pero si contra los que recibieron Purina y DG por 4 semanas. En

colesterol HDL, todos los grupos con DG tuvieron valores similares entre ellos y más elevados que el grupo control con Purina. El cambio a Purina tendió a reducir el porcentaje de colesterol HDL en comparación con la DG, a un porcentaje similar al del grupo con Purina por 4 semanas, pero la adición con Gobernadora a la Purina indujo el mayor porcentaje de todos los grupos, siendo significativamente diferente al del grupo con DG.

**Tabla 4. Glucosa y lípidos plasmáticos.\***

Grupos y Dietas	Glucosa (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol total (mg/dl)	% Colesterol HDL
Purina n = 6	160 ± 7 <sub>a,b</sub>	197 ± 46 <sub>a</sub>	215 ± 27 <sub>a</sub>	45 ± 9 <sub>a</sub>
Dieta grasa (DG) n = 6	167 ± 18 <sub>a</sub>	248 ± 67 <sub>a</sub>	280 ± 38 <sub>b</sub>	70 ± 10 <sub>b,c</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 6	147 ± 26 <sub>a,b,c</sub>	72 ± 29 <sub>b</sub>	93 ± 17 <sub>d</sub>	79 ± 12 <sub>b,d</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 6	145 ± 9 <sub>a,b,c</sub>	110 ± 20 <sub>b,c</sub>	150 ± 26 <sub>c,e</sub>	74 ± 6 <sub>b,c,d</sub>
Dieta grasa ---> Purina n = 6	130 ± 8 <sub>b,c,d</sub>	256 ± 36 <sub>a</sub>	188 ± 36 <sub>a,c</sub>	58 ± 12 <sub>a,c</sub>
DG -->Purina + Ezetimiba 3mg% n = 6	125 ± 19 <sub>c,d</sub>	196 ± 41 <sub>a</sub>	160 ± 13 <sub>c</sub>	86 ± 6 <sub>b,d</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 6	107 ± 14 <sub>d</sub>	182 ± 56 <sub>a,c</sub>	109 ± 24 <sub>d,e</sub>	91 ± 4 <sub>d</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

### Insulina y Leptina en suero

Respecto a las concentraciones de Insulina y Leptina séricas, mostradas en la **Tabla 5**, se observó un incremento significativo en los grupos con DG y DG con Ezetimiba respecto al grupo con Purina. Adicionada a la dieta grasa, la Gobernadora redujo, respecto al grupo con DG, las concentraciones de Insulina y Leptina significativamente, a valores similares a los del grupo con solo Purina. La adición de Gobernadora a la Purina disminuyó significativamente, respecto al grupo que cambio de DG a Purina, aún más la insulina y la leptina. Mientras que con la Ezetimiba ambas hormonas no fueron significativamente diferentes del grupo con DG.

**Tabla 5. Insulina y Leptina séricas.\***

Grupos y Dietas	Insulina (ng/ml)	Leptina (ng/ml)
Purina n = 6	18.0 ± 1.0 <sub>a,d</sub>	0.59 ± 0.27 <sub>a,d</sub>
Dieta grasa (DG) n = 6	24.6 ± 1.9 <sub>b</sub>	1.35 ± 0.27 <sub>c</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 6	22.7 ± 1.8 <sub>b,c</sub>	1.05 ± 0.21 <sub>b,c</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 6	20.4 ± 1.9 <sub>a,c</sub>	0.52 ± 0.06 <sub>a,d</sub>
Dieta grasa ---> Purina n = 6	24.1 ± 1.0 <sub>b</sub>	0.70 ± 0.15 <sub>a,b</sub>
DG --> Purina + Ezetimiba 3mg% n = 6	22.4 ± 1.7 <sub>b,c</sub>	0.93 ± 0.36 <sub>a,c</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 6	15.6 ± 2.5 <sub>d</sub>	0.28 ± 0.11 <sub>d</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

### **Tolerancia a insulina**

En las curvas de tolerancia a insulina (**Tabla 6**), hubo diferencias significativas en la velocidad de disminución de la glucosa plasmática expresada en mg/dl/min. La menor velocidad la presentó el grupo con DG. Las adiciones de Ezetimiba o Gobernadora a la DG indujeron velocidades de reducción de la glucosa, similares a la del grupo con Purina. El cambio de DG a Purina provocó menor resistencia a la acción de la insulina que con DG, mientras que mayores velocidades se obtuvieron en los grupos que además recibieron Ezetimiba o Gobernadora, similares a las del grupo con Purina por 4 semanas. En la velocidad de reducción de la glucosa expresada como porcentaje de disminución de ésta en el tiempo respecto a la concentración inicial se observó algo similar, pero los valores de las desviaciones estándar fueron menores y así el grupo con DG y Gobernadora si tuvo una velocidad significativamente diferente a la del grupo con DG. Así mismo, al cambiar de DG a Purina, la adición de Gobernadora provocó una velocidad significativamente mayor que con solo cambiar a Purina.

**Tabla 6. Tolerancia a insulina.\***

Grupos y Dietas	Reducción de glucosa mg/dl/min	Reducción de glucosa % /min
Purina n = 5	6.32 ± 2.44 <sub>a</sub>	4.58 ± 2.19 <sub>a,c</sub>
Dieta grasa (DG) n = 5	0.42 ± 2.56 <sub>b</sub>	0.65 ± 1.82 <sub>b</sub>
DG + Ezetimiba 0.003% n = 5	4.98 ± 1.91 <sub>a</sub>	2.46 ± 0.41 <sub>a,d</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 5	3.65 ± 2.71 <sub>a,b</sub>	2.09 ± 0.96 <sub>a,e</sub>
Dieta grasa ---> Purina n = 6	4.08 ± 1.36 <sub>a</sub>	2.55 ± 1.02 <sub>a,f</sub>
DG-->Purina + Ezetimiba 0.003% n = 5	6.05 ± 2.06 <sub>a</sub>	3.86 ± 0.76 <sub>c,d,e,f</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 4	7.51 ± 1.80 <sub>a</sub>	5.96 ± 0.66 <sub>c</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05)

### Parámetros y lípidos hepáticos

Después de 4 semanas con DG lo animales de este grupo, mostraron los valores más elevados en peso absoluto del hígado, el cual presentaba un color más claro y un patrón en forma de mosaico, indicando esteatosis hepática (**Tabla 7**). La adición de Ezetimiba redujo significativamente el peso del hígado, respecto al grupo con DG, a valores mayores pero estadísticamente similares a los inducidos por Purina. La Gobernadora en la DG disminuyó el peso del hígado, pero no alcanzó a ser significativo al del grupo con DG cuando se expresó en forma porcentual del peso corporal, sin embargo la apariencia del hígado era normal. De la misma manera, el cambio a la dieta de Purina redujo el peso pero solo significativamente en el valor absoluto del hígado. La Purina con Ezetimiba o Gobernadora redujo aún más los valores, siendo todos significativamente diferentes del grupo con DG y similares al que recibió Purina por 4 semanas.

Respecto a los lípidos hepáticos, mostrados en la **Tabla 7**, se observó un incremento significativo en todos ellos en el grupo de animales alimentados con la DG al compararla con la Purina. Con ésta dieta, la Gobernadora y la Ezetimiba redujeron los lípidos totales significativamente, siendo mayor el efecto con la última respecto al grupo con DG. El cambio a Purina en vez de DG también redujo este parámetro significativamente a valores similares a los de animales con solo Purina por 4 semanas. La adición de Gobernadora o Ezetimiba redujo los lípidos totales aún más, aunque no significativamente diferentes a los de grupo que cambio a solo Purina.

La adición de Gobernadora o Ezetimiba a la DG no redujo significativamente los triglicéridos hepáticos respecto a los grupos con solo Purina y DG. El cambio a Purina redujo significativamente los triglicéridos respecto a DG, al igual que la adición de Gobernadora o Ezetimiba a Purina, estos dos últimos grupos no tuvieron efecto significativo respecto al grupo que cambio de DG a Purina.

Gobernadora en DG no disminuyó significativamente los niveles de colesterol hepático respecto al grupo con DG, mientras que la Ezetimiba sí lo hizo. El cambio a Purina disminuyó el colesterol hepático y la adición de Gobernadora y Ezetimiba lo redujeron aún más, los tres respecto al grupo con DG, pero no fueron los valores significativamente diferentes a los del grupo que cambio a solo Purina.

**Tabla 7. Parámetros hepáticos.\***

Grupos y Dietas	Hígado (g)	Hígado (% p.c.)	Lípidos totales (mg/g/ hig.)	Triglicéridos (mg/g híg.)	Colesterol (mg/g híg.)
Purina n = 6	4.5 ± 0.8 <sub>a</sub>	4.0 ± 0.6 <sub>a</sub>	23 ± 6 <sub>a</sub>	7.4 ± 2.0 <sub>a,d</sub>	2.3 ± 0.7 <sub>a</sub>
Dieta grasa (DG) n = 6	7.2 ± 0.8 <sub>b</sub>	5.4 ± 0.3 <sub>b</sub>	62 ± 10 <sub>b</sub>	13.4 ± 0.9 <sub>b</sub>	5.4 ± 1.0 <sub>b</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 6	5.4 ± 0.6 <sub>a,c</sub>	4.1 ± 0.2 <sub>a</sub>	24 ± 4 <sub>a</sub>	12.2 ± 3.7 <sub>b,c</sub>	2.1 ± 0.7 <sub>a</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 6	5.8 ± 0.7 <sub>c</sub>	4.9 ± 0.3 <sub>b</sub>	41 ± 10 <sub>c</sub>	10.9 ± 2.1 <sub>a,b</sub>	4.3 ± 1.1 <sub>b,c</sub>
DG ---> Purina n = 6	5.9 ± 0.6 <sub>c</sub>	4.9 ± 0.4 <sub>b</sub>	31 ± 7 <sub>a,c</sub>	8.2 ± 1.2 <sub>a,d</sub>	3.0 ± 1.1 <sub>a,c</sub>
DG --> Purina + Ezetimiba 3mg% n = 6	5.3 ± 0.9 <sub>a,c</sub>	4.2 ± 0.3 <sub>a</sub>	19 ± 7 <sub>a</sub>	9.0 ± 1.1 <sub>a,c,d</sub>	1.5 ± 0.9 <sub>a</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 6	4.4 ± 0.7 <sub>a</sub>	3.9 ± 0.3 <sub>a</sub>	20 ± 9 <sub>a</sub>	7.3 ± 0.7 <sub>d</sub>	2.0 ± 0.5 <sub>a</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

### **Peroxidación y capacidad antioxidante en hígado**

En la **tabla 8** se muestra el grado de peroxidación y la capacidad antioxidante en hígado, estimados como niveles de TBARS y grado de reducción del DPPH, respectivamente. Se observa que el grupo con Purina presenta un mayor nivel de TBARS que el que recibió DG, con una capacidad antioxidante similar entre ambos grupos. Cuando el grupo con DG recibe extracto de Gobernadora tiende a reducirse la peroxidación y se incrementa la capacidad antioxidante significativamente respecto a los grupos con Purina y DG con Ezetimiba, mientras que Ezetimiba en DG no afecto significativamente TBARS ni la capacidad antioxidante respectoa DG. La capacidad antioxidante y TBARS en los grupos que cambiaron

a Purina fue similar entre todos ellos y no fueron significativamente diferentes de los grupos con solo Purina por 4 semanas y el de DG.

**Tabla 8. Peroxidación y capacidad antioxidante en hígado.\***

Grupos y Dietas	Malonaldehído (nmol/g hígado)	Capacidad Antioxidante (Eq µg Asc/ml ensayo)
Purina n = 4	208 ± 8 <sub>a</sub>	3.67 ± 0.40 <sub>a</sub>
Dieta grasa (DG) n = 4	114 ± 8 <sub>b,c</sub>	3.75 ± 0.06 <sub>a</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 4	145 ± 44 <sub>a,c</sub>	3.82 ± 0.15 <sub>a</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 4	45 ± 8 <sub>b</sub>	5.27 ± 0.32 <sub>b</sub>
Dieta grasa ---> Purina n = 4	207 ± 21 <sub>a</sub>	4.65 ± 0.72 <sub>a,b</sub>
DG --> Purina + Ezetimiba 3mg% n = 4	166 ± 72 <sub>a,c</sub>	4.35 ± 0.76 <sub>a,b</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 4	116 ± 34 <sub>b,c</sub>	4.72 ± 0.51 <sub>a,b</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

### Parámetros biliares

Las concentraciones de lípidos en la bilis vesicular se muestran en la **Tabla 9**. Los fosfolípidos aumentaron en los grupos con DG respecto a Purina. Aún después de cambiarlos a Purina por 2 semanas los fosfolípidos continuaron elevados con o sin adición de Gobernadora o Ezetimiba. Las sales biliares no fueron diferentes entre los grupos con Purina y DG, la Ezetimiba tampoco alteró significativamente la concentración, solo Gobernadora con DG redujo las sales biliares. El cambio de DG a Purina disminuyó las sales biliares respecto a Purina y DG, con la adición de Ezetimiba y Gobernadora estas no fueron significativamente diferentes del grupo con dieta grasa sola. El colesterol biliar aumento con la DG sola y con Ezetimiba, mientras que la Gobernadora lo volvió a los niveles del control de Purina. El cambio de DG a Purina redujo la concentración a valores similares al grupo con Purina, sin que la Ezetimiba y la Gobernadora tuvieran un efecto significativo. El porcentaje que el colesterol representa de los 3 lípidos biliares, el cual es una estimación de la saturación de la bilis con colesterol, aumentó con la DG y con la DG adicionada de Ezetimiba, respecto a Purina, mientras que con la Gobernadora no fue significativamente diferente de Purina y DG control. El regreso a dieta de Purina causó que este parámetro regresara a valores control, sin que la Ezetimiba y la Gobernadora tuvieran un efecto.

**Tabla 9. Composición de bilis vesicular.\***

Grupos y Dietas	Fosfolípidos Mm	Sales biliares mM	Colesterol mM	% Molar Colesterol
Purina n = 6	4.77 ± 1.23 <sub>a</sub>	19.7 ± 3.3 <sub>a,c</sub>	0.35 ± 0.15 <sub>a,c</sub>	1.1 ± 0.51 <sub>a</sub>
Dieta grasa (DG) n = 6	11.30 ± 0.73 <sub>b</sub>	18.6 ± 3.3 <sub>a,d</sub>	0.67 ± 0.09 <sub>b</sub>	2.1 ± 0.25 <sub>b</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 6	13.49 ± 3.28 <sub>b</sub>	24.1 ± 3.0 <sub>a</sub>	0.58 ± 0.19 <sub>a,b</sub>	2.2 ± 0.89 <sub>b,c</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 6	13.42 ± 1.02 <sub>b</sub>	13.5 ± 3.0 <sub>b,d</sub>	0.41 ± 0.09 <sub>a,c</sub>	1.5 ± 0.33 <sub>a,b</sub>
DG ---> Purina n = 6	12.86 ± 0.21 <sub>b</sub>	11.5 ± 3.0 <sub>b</sub>	0.24 ± 0.15 <sub>c</sub>	1.2 ± 0.25 <sub>a,b</sub>
DG --> Purina + Ezetimiba 3mg% n = 6	11.58 ± 0.77 <sub>b</sub>	15.7 ± 3.9 <sub>b,c,d</sub>	0.41 ± 0.12 <sub>a,c</sub>	1.3 ± 0.39 <sub>a,b</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 6	11.53 ± 0.69 <sub>b</sub>	17.4 ± 1.0 <sub>b,c,d</sub>	0.35 ± 0.08 <sub>a,c</sub>	1.3 ± 0.15 <sub>a,c</sub>

\*Media ± DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05).

### Esteroles fecales neutros

Respecto a las concentraciones de esteroides fecales, mostradas en la **tabla 10**, se observó un incremento significativamente mayor con la DG adicionada de Ezetimiba respecto a Purina y DG. El grupo con DG adicionada de Gobernadora tuvo un incremento significativo, aunque menor que con Ezetimiba, respecto a Purina. El cambio de DG a Purina no afectó significativamente la concentración de esteroides fecales respecto a DG, tampoco lo hizo la adición de Gobernadora, solo el grupo con Ezetimiba tuvo un aumento significativo en la concentración de esteroides fecales respecto al grupo con DG. En ambos grupos que recibieron extracto, los esteroides fecales no fueron significativamente diferentes de sus controles, lo que indica que el efecto del extracto no está relacionado a una reducción de la absorción intestinal de colesterol o al incremento en su excreción.

**Tabla 10. Esteroles fecales neutros .\***

Grupos y Dietas	Esteroles ( $\mu\text{g/g}$ de heces)
Purina n = 4	5.0 $\pm$ 0.6 <sub>a</sub>
Dieta grasa (DG) n = 4	5.5 $\pm$ 0.4 <sub>a,c</sub>
DG + Ezetimiba 3mg% n = 4	11.0 $\pm$ 0.8 <sub>b</sub>
DG + Gobernadora 0.2% n = 4	7.0 $\pm$ 0.5 <sub>c,d</sub>
Dieta grasa ---> Purina n = 4	6.6 $\pm$ 0.9 <sub>c,d</sub>
DG --> Purina + Ezetimiba 3mg% n = 4	7.5 $\pm$ 0.6 <sub>d</sub>
DG --> Purina + Gobernadora 0.2% n = 4	6.2 $\pm$ 0.7 <sub>a,c,d</sub>

\*Media  $\pm$  DE. Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos ( $P < 0.05$ ).

## Discusión

La dieta grasa empleada en este experimento contenía 0.1% de colesterol, a diferencia de la usada anteriormente que contenía 0.5%. Dietas con diversos niveles de colesterol han sido utilizadas en modelos de roedores. Wang et al., (2001) utilizaron en hámsteres una dieta no purificada alta en grasa a base de Purina, aceite de coco y aceite de maíz, cada uno al 11.5%, colesterol al 0.5% y desoxicolato al 0.25%, la cual fue suministrada durante 3 semanas, además de fructosa en el agua al 10%. Encontraron incrementos en el peso corporal, el colesterol total, triglicéridos y glucosa, mayores a los de nuestro estudio, en particular en triglicéridos y glucosa, mientras que, al contrario de nuestros resultados, la insulina sérica se redujo. Aunque la grasa en la dieta solo alcanzó 23%, la fructosa, el ácido desoxicólico, que reduce la síntesis de sales biliares a partir del colesterol, y el colesterol al 0.5%, hacen que esta dieta induzca parámetros muy alterados, haciendo de este un modelo muy atípico con una exagerada lipotoxicidad (Wang et al., 2001). En otro estudio se analizó el efecto de una dieta purificada, con niveles normales de grasa (5%) a base de manteca de cerdo y adicionada de colesterol en concentraciones que iban del 0.3 al 0.9%, en hámsteres y ratas durante 6 semanas. Los hámsteres presentaron incrementos en triglicéridos, colesterol total y HDL séricos, así como en colesterol hepático, proporcionales al incremento en la concentración de colesterol. El nivel de 0.3% de este estudio semeja los resultados encontrados en el presente trabajo, particularmente en el incremento en colesterol HDL. En cambio, con esa dieta las ratas respondieron mucho menos, lo que indica que los hámsteres y las ratas metabolizan el colesterol de manera diferente. Así mismo, el estudio de Zhang et al. (2009b),

muestra que en el hámster con solo aumentar el colesterol dietético, además de incrementarse el colesterol, los triglicéridos séricos aumentan. No obstante, otro estudio mostró que con un nivel dietético moderadamente alto de colesterol (0.12%) la adición de 15% de grasa, ya sea como trimiristina, trioleína o trilinoleína, aumentan mucho más el peso corporal, el peso del hígado, el colesterol hepático, así como la insulina, la leptina, el colesterol total y los triglicéridos séricos (van Heek et al., 2001). En el estudio de Valasek et al., (2008), hámsteres recibieron dieta de mantenimiento adicionada con colesterol al 1% y aceite de cártamo al 10% durante 28 días, encontrándose incrementos en el colesterol total plasmático, hepático y biliar, con mayor porcentaje molar de colesterol biliar, sin cambios significativos en sales biliares y fosfolípidos en la bilis, así como hígado graso. Estos resultados son similares a los encontrados por nosotros en este trabajo respecto al porcentaje molar de colesterol biliar, pero en nuestro caso los fosfolípidos si se elevaron con la dieta grasa, muy probablemente debido al que el nivel de grasa en la dieta fue el doble del utilizado por Valasek et al. (2008). Debido a la poca cantidad de colesterol de la manteca de cerdo (57mg%; SARA- Ministerio de Salud de la Nación Argentina), es necesario agregarle más para obtener los parámetros de síndrome metabólico en el hámster, siendo la concentración de 0.1% en la dieta, la que produce alteraciones significativas sin que ocurra demasiada lipotoxicidad.

## **Género**

En humanos, la prevalencia del síndrome metabólico es ligeramente mayor en mujeres que en hombres (Beigh and Jain, 2012; Marquez-Sandoval et al., 2011; Beltrán-Sánchez et al., 2013). En el presente estudio solo se utilizaron machos, debido a que la respuesta a la dieta alta en grasa es más pronunciada en machos que en hembras, siendo los machos los que tienen mayores concentraciones plasmáticas de colesterol total, TG, y mayor índice litogénico en bilis (Morise et al., 2006). En otro estudio, los hámsteres de diferente sexo y edad fueron alimentados con dieta alta en calorías, la dislipidemia se desarrolló en los machos, irrespectivamente de su edad, mientras que en las hembras solamente se desarrolló con la edad (Zagayco et al., 2015). Sin embargo, falta establecer si el extracto de *Larrea tridentata* tiene los mismos efectos en hembras, que provoca en los machos.

## **Ganancia de peso y obesidad**

Los hámsteres con DG durante las 2 primeras semanas alcanzaron mayor peso que los que recibieron Purina. En las 2 semanas de tratamiento, el consumo de alimento fue similar entre los grupos, excepto el que cambio a Purina con Ezetimiba que comieron más por día, siendo al final del periodo experimental los segundos con mayor peso corporal. A pesar de que el consumo fue similar entre los grupos, excepto Purina con Ezetimiba, el peso corporal fue mayor en los que recibieron solo dieta grasa. El cambio de DG a Purina con Gobernadora alcanzó el mismo peso que los que recibieron Purina por 4 semanas, esto no fue debido a un menor consumo de alimento, ya que el primero consumió ligeramente más que el segundo. La grasa epididimal también refleja una menor acumulación de grasa en ese grupo, y tuvo sus mayores valores en los animales que recibieron solo dieta grasa seguidos por los que recibieron Ezetimiba, con y sin dieta grasa. Se ha publicado que la Ezetimiba en la DG no afecta la

ganancia de peso corporal ni en hámsteres (van Heek et al., 2001) ni en ratones (Muraoka et al., 2011). En nuestro estudio no difirieron en la cantidad de grasa epididimal y fueron los segundos con mayor peso corporal. Los que recibieron extracto de Gobernadora fueron los que alcanzaron el menor peso corporal de sus grupos con la misma dieta, por lo que al parecer el extracto de Gobernadora pudo haber impedido la absorción de nutrientes o aceleró el metabolismo, de manera que en las 2 semanas con Purina y extracto estos grupos ganaron menos peso a pesar de un consumo similar. A corto plazo hay un beneficio, sin embargo, a largo plazo este puede ser un efecto tóxico, considerando que el uso excesivo de Gobernadora puede llevar a toxicidad hepática y renal (Sheikh 1997; Gordon et al., 1995). Los herbívoros generalistas pueden evitar la intoxicación ingiriendo pequeñas cantidades de una mezcla de metabolitos secundarios de plantas. Sin embargo, un solo compuesto, uno altamente tóxico o el más abundante en la mezcla es el que podría causar la intoxicación. En un estudio, la sobrevida y la toxicidad en ratones Rockland machos fueron evaluadas para determinar si los efectos tóxicos de la resina fenólica de jarilla (*Larrea divaricata* Cav.) se debe a su compuesto mayoritario, el NDGA, o a la concentración total de compuestos fenólicos en esta resina. La ingesta voluntaria de resina adicionada al 5 % en la dieta de mantenimiento para roedores por estos ratones tuvo un efecto tóxico pronunciado, evidenciado en una pérdida en masa corporal y una reducción significativa de la ingesta de alimento. Ratones a los que se suministró, de manera oral forzada, resina (100mg), NDGA (100mg) o NDGA (15mg) mostraron una reducción significativa de la sobrevida comparada con ratones Control. Animales expuestos a NDGA (15mg) tuvieron una sobrevida equivalente a la de los animales expuestos a resina (100mg, que contienen 15mg de NDGA); la menor sobrevida la presentaron los animales expuestos a 100mg de NDGA. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en la desintoxicación medida como excreción urinaria de conjugados de ácido glucurónico. Puesto que 15 mg de NDGA fueron suficientes para producir el mismo efecto que la resina total, se sugiere que el NDGA, compuesto principal de la resina de *Larrea divaricata*, es el responsable del efecto tóxico de esta planta (Ríos et al., 2008).

### **Parámetros plasmáticos**

El extracto de Gobernadora o Ezetimiba en la dieta tanto alta en grasa como con Purina, redujeron o tendieron a reducir los parámetros plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol total, en comparación con la dieta grasa sola. Los efectos reductores de la glucosa y triglicéridos plasmáticos por el extracto etanólico de Gobernadora fueron menores a los reportados anteriormente para el metabolito secundario más abundante en el extracto etanólico de Gobernadora, el NDGA (Masoprocol), el cual se suministró a dosis de 150 mg/kg de manera oral forzada a ratones *db/db* y *ob/ob* con dieta estándar (Luo et al., 1998) y 0.83 mmol/kg a ratas que recibieron dieta grasa y además fueron tratadas con estreptozotocina (Reed et al., 1999). Las diferencias pueden ser debidas no solo al modelo, sino a que las dosis de NDGA usadas en esos estudios (250mg/kg p.c.) fueron mayores a las suministradas con el extracto de Gobernadora en este trabajo, que con consumo de alimento por animal entre 7 y 10g/día en el periodo de 2 semanas que recibieron el extracto, y considerando el contenido de 8.9% de NDGA en el presente estudio o de 26% de NDGA en el extracto etanólico (Mabry et al., 1981) nos da una dosis de

entre 10 y 45mg/kg p.c. En un experimento preliminar, suministramos NDGA, adicionado en dieta grasa al 0.1%; el NDGA fue primero disuelto en 10 ml de etanol y posteriormente adicionado a la Purina. Los resultados de este experimento mostraron incrementos significativos en peso corporal, peso del hígado y grasa epididimal, así como en glucosa, triglicéridos y colesterol total entre el grupo con dieta grasa comparado con el grupo control alimentado con Purina. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en esos mismos parámetros entre los animales que recibieron dieta grasa y NDGA (ver **Apéndice I**), lo cual difiere de lo reportado por Luo et al. (1998) y Reed et al. (1999). Especulamos que estas diferencias pueden deberse a que el NDGA en la dieta grasa pudiera haberse oxidado o de otra forma perder su actividad. También a diferencia de nosotros, ellos lo suministraron de manera oral forzada en una sola dosis, mientras que en el presente estudio, aunque las cantidades de NDGA consumido fueron similares, el compuesto se adicionó a la dieta grasa. Así mismo, es posible que las diferencias se deban a los modelos empleados, ya que ellos emplearon ratas con estreptoizotocina y ratones genéticamente modificados.

### **Insulina y leptina**

Otras características del síndrome metabólico son la hiperinsulinemia, hiperleptinemia y resistencia a insulina. Estos tres parámetros están presentes en los hámsteres alimentados con la dieta alta en grasa. La principal causa fisiológica de la hipersecreción de leptina es la expansión de adipocitos inducida por la dieta. Los niveles de leptina en circulación son directamente proporcionales a los almacenes energéticos del cuerpo. Cuando se excede la capacidad de almacenaje energético de los adipocitos en el periodo del sobrepeso/obesidad y el inicio del síndrome metabólico, se desarrolla la resistencia a la leptina (Moon et al., 2013). Esta falta de acción de la leptina lleva a la sobrealimentación y mayor almacenamiento de grasa en tejidos no adiposos, caracterizada por elevación de ácidos grasos libres, esteatosis generalizada, lipotoxicidad y lipoapoptosis que lleva a la resistencia a la insulina (Unger et al., 2010). En condiciones normales, la leptina suprime la producción hepática de glucosa, la lipogénesis *de novo* e induce la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos, generando un efecto antiesteatósico y sensibilizante a la insulina. Los factores que promueven la secreción de leptina en humanos son: obesidad, sobrealimentación, glucosa, aminoácidos, insulina, glucocorticoides, estrógenos, citocinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6. Los niveles de leptina bajan con la pérdida de peso (Moon et al., 2013). Respecto a la insulina y a la leptina séricas, la dieta grasa induce una hiperinsulinemia y una hiperleptinemia, las cuales no son afectadas por la Ezetimiba, pero si son normalizadas por el extracto de Larrea. Al retirar la dieta grasa y suministrar una dieta de Purina, la hiperinsulinemia persiste hasta las 2 semanas del estudio, mientras que la leptina ya se ha normalizado. De nuevo, la adición de Ezetimiba no afectó estos cambios, pero la adición de extracto de Larrea a la Purina causa la mayor disminución tanto en insulina como en leptina séricas. Esto significa que aunque quitar la grasa excesiva de la dieta mejora la sensibilidad a estas hormonas, el extracto de Gobernadora mejora aún más esta sensibilidad. Estos efectos pueden relacionarse a una menor ganancia de peso corporal y menor adiposidad, como lo indica el menor peso de la grasa epididimal en ambos grupos con extracto, pero no debido a un menor consumo de alimento.

Varios compuestos fenólicos como el resveratrol, oleuropeína y miricitina, así como precursores y derivados de fenoles, como la polidatina, se ha encontrado que reducen los niveles circulantes de leptina en estudios *in vivo*, utilizando diferentes tipos de modelos (Aragonés et al., 2016). Además de los compuestos fenólicos, otros metabolitos secundarios de plantas, como los isotiocianatos y algunos terpenoides incluyendo timol, saponinas y licopenos entre otros, se ha mostrado que reducen los niveles de leptina al ser administrados en roedores (Aragonés et al., 2016). No se han establecido los mecanismos de acción para la mayoría de estos compuestos. El resveratrol incrementa la actividad de AMPK, reduciendo lipogénesis e incrementado la oxidación de lípidos (Zhang et al., 2009a). Otros, como algunas coumarinas, flavonoides y polifenoles de algunos jugos de frutas, podrían actuar como agonistas de PPARs e incluso mejorar el transporte de la leptina a través de la barrera hematoencefálica (Aragonés et al., 2016), mejorando la oxidación de ácidos grasos en exceso y reduciendo la lipotoxicidad (Unger et al., 2010). Falta establecer como el extracto de Gobernadora, probablemente a través del NDGA, reduce la resistencia a leptina y mejora la sensibilidad a insulina. En un estudio con hámsteres y dietas grasas (van Heek, 2001), se encontró que la hiperinsulinemia se produce con solo la adición de colesterol (0.12%) a la dieta de Purina, mientras que la leptina no cambia. Sin embargo, al agregar 15% de grasa a la Purina con colesterol, en la forma de trimistina, trioleína o trilinoleína se produce tanto la hiperinsulinemia como la hiperleptinemia, como ocurrió en nuestro estudio. En este mismo estudio se encontró que la Ezetimiba reduce tanto el colesterol como los triglicéridos séricos, sin afectar el peso corporal, glucosa, insulina y leptina séricas, como ocurrió en el presente trabajo.

### **Tolerancia a la Insulina**

La sensibilidad a insulina exógena fue menor en los animales con dieta grasa, de acuerdo con la prueba de tolerancia a la insulina; mientras que los grupos con extracto de Gobernadora o Ezetimiba en la dieta respondieron más a la hormona, siendo similar a la de los grupos controles con dieta de mantenimiento. La sustitución de la dieta grasa por Purina también mejora la sensibilidad a la insulina, sin embargo la adición de Ezetimiba y extracto de Larrea eleva aún más esta sensibilidad. Se ha publicado que la Ezetimiba aumenta la tolerancia a la insulina en ratones obesos con dieta grasa, pero no en ratones con dieta estándar (Muraoka et al., 2011).

### **Parámetros hepáticos**

La dieta grasa empleada incrementa el tamaño del hígado, así como los lípidos hepáticos, como ya ha sido publicado (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008). El extracto de Gobernadora disminuye, los lípidos totales y con el nivel suministrado tiende a reducir el tamaño del hígado, los triglicéridos y el colesterol. Zhang et al., (2015) reportan una reducción de triglicéridos con NDGA, en ratas con dieta alta en fructosa. El efecto de la Ezetimiba fue mayor en este aspecto, con resultados similares a los previamente publicados en hámster (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008) y en ratones (Muraoka et al., 2011). La sustitución de dieta grasa por dieta de Purina durante 2 semanas, disminuye los lípidos hepáticos y tiende a reducir el peso porcentual del hígado. La adición de extracto de Gobernadora induce mayores reducciones tanto en el tamaño como en los lípidos hepáticos, es decir acelera la normalización

de estos parámetros. La Ezetimiba adicionada a la Purina disminuye el peso del hígado, los lípidos totales y el colesterol, pero no los triglicéridos. En el estudio de Valasek (2008) la Ezetimiba no redujo el colesterol hepático cuando se adiciona a la dieta básica, pero si a la dieta grasa alta en colesterol. Esta diferencia con nuestro estudio puede deberse a que los hámsteres del presente trabajo venían de haber recibido dieta grasa y no de dieta básica como en el estudio de Valasek (2008).

Lee et al (2010) publicaron que en ratones C57BL/6J alimentados con dieta grasa, el NDGA induce una menor acumulación de triglicéridos a través de vías de señalización de la AMPK. En el extracto de Gobernadora el análisis por HPLC muestra que contiene 8.9% de NDGA que muy probablemente es el responsable de estos efectos, además de otros compuestos que podrían ser otros lignanos como el ácido guayarético y derivados O-metilados. Así mismo, entre los otros componentes del extracto de Gobernadora están los polifenoles, que incluyen los flavonoides (Timmermann et al., 1981; Vázquez-Yanes et al., 1999; Arteaga et al., 2005a) que han sido utilizados para tratar el síndrome metabólico. Durante muchos años, los efectos benéficos en la salud de los flavonoides han sido adscritos a su capacidad antioxidante que resulta de que capturan los radicales libres o quelan metales prooxidantes. También pueden mejorar las dislipidemias al modular la absorción de lípidos y la lipogénesis (Galleano et al., 2012). Gnabre et al., (2015) señala que La acción combinada de los lignanos y flavonoides presentes en el extracto etanólico de Gobernadora parece ser sinérgica, ejerciendo mayor actividad que cuando se utiliza solo un compuesto. Falta establecer si el empleo tradicional de Gobernadora, es decir como “agua de uso” en el tratamiento de la diabetes, ejerce los mismos efectos del extracto etanólico. Tanto el té y la tintura de Gobernadora contienen 10 y 25% respectivamente, de lignanos activamente en el extracto total (Gnabre et al., 2015).

Una característica común de muchos metabolitos secundarios es que son “promiscuos” en cuanto a los blancos fisiológicos que afectan. Por lo anterior, su actividad biológica es multifuncional, esto es, puede ocurrir sobre muchas especies silvestres u organismos patógenos o procesos patológicos en humanos. La multifuncionalidad frecuentemente depende de la concentración. Típicamente las concentraciones pequeñas de metabolitos secundarios tóxicos en modelos o pacientes producen estimulación, también llamada hormesis. En otros casos los efectos agónicos o antagónicos de un mismo compuesto dependen de la especie de organismo. Para establecer estos es necesario revisar la riqueza de metabolitos secundarios, su acción como compuestos aislados y los mecanismos que producen variación en las escalas de diversidad fitoquímica (García-Rodríguez et al., 2012). La producción de aceites esenciales pudiera tener distintas funciones, así, durante el verano, su biosíntesis actuaría como una "válvula de seguridad" que removería el exceso de carbono y energía que no puede ser procesada por una planta bajo estrés térmico o hídrico. También podría mantener los sistemas enzimáticos en un estado que permita la rápida reactivación al regresar a condiciones favorables. Adicionalmente algunos metabolitos secundarios desempeñan funciones fisiológicas, por ejemplo: los alcaloides y péptidos (lectinas, inhibidores de proteasas) sirven para movilizar y transportar nitrógeno tóxico. Los compuestos fenólicos, son producidos por las plantas en respuesta a estrés abiótico, como altitud elevada, frío, sequía, deficiencias de nutrientes y radiación UV. En plantas superiores, los fenilpropanoides como el ácido hidroxicinámico, los ésteres de cinamoil, flavonas, flavonoles y antocianinas proveen protección

contra UV-A y UV-B y también son tóxicos para insectos y exhiben actividad fungistática. En los tejidos vegetales, la fotosíntesis y la respiración requieren del transporte de electrones entre moléculas. Cuando este mecanismo no es eficiente se producen compuestos con un alto potencial destructivo llamados especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Varios fenoles, alcaloides y terpenoides pueden reducir estos compuestos transformándolos en otros menos dañinos actuando como antioxidantes.

La alelopatía es el efecto perjudicial de los metabolitos secundarios de una planta sobre otra o sobre microbios. Los compuestos con potencial alelopático se pueden encontrar en todos los tejidos de la planta y liberarse por volatilización, lixiviación, exudación o descomposición de materia orgánica. Los principales compuestos alelopáticos son terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas) y fenoles (ácidos fenólicos, derivados del ácido cinámico, cumarinas, flavonoides, quinonas y taninos). Los alcaloides también pueden ser alelopáticos. Las hojas y semillas de *Datura stramonium* contienen alcaloides de tipo tropano (hiosciamina y escopolamina) que pueden mantener su toxicidad durante semanas en el suelo. Debido a que la alelopatía representa una ventaja competitiva para las plantas, se ha estudiado con particular interés en especies invasoras. En *Centaurea stoebe* se ha descubierto que las raíces exudan (-)-catequina, que inhibe el crecimiento de las plantas vecinas. Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas sintetizados por las plantas al ser atacadas por patógenos. Su naturaleza es diversa: terpenoides, alcaloides, ácidos grasos, alcanos, cumarinas, taninos, ácidos hidroxámicos cíclicos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos; muchos de ellos son también tóxicos para animales herbívoros. Los metabolitos secundarios actúan de diversas maneras sobre los herbívoros, ya sea disuadiendo el ataque o afectando su crecimiento, desarrollo, sobrevivencia, salud, reproducción y respiración (García-Rodríguez et al., 2012). La Gobernadora presenta compuestos con actividades como las de los mencionados, lo que podría explicar su exitosa adaptación y dominancia en el desierto, y su uso como planta medicinal.

### **Peroxidación y capacidad antioxidante en hígados**

El estrés oxidativo ha estado implicado en el desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (Hopps et al., 2010). Ya que el principal metabolito del extracto etanólico es el NDGA, un antioxidante reconocido, se analizó la peroxidación y capacidad antioxidante en hígados, determinadas por TBARS y DPPH, respectivamente. La DG reduce la peroxidación, mientras que la capacidad antioxidante fue igual que con la Purina. Esta reducción de TBARS con la dieta alta en grasa y con colesterol es similar a la reportada en ratones alimentados con dieta que contenía manteca de cerdo al 10% (Ibrahim et al., 1997). Ese estudio mostró que la presencia de ácidos grasos insaturados en la dieta aumenta la susceptibilidad a la peroxidación de lípidos. En sus ratones con aceite de pescado, el cual contiene ácidos grasos altamente insaturados, se presentó una mayor concentración de TBARS en hígado que los que tenían manteca de cerdo, independientemente de la cantidad de vitamina E presente en la dieta. Esto indica que en el hámster alimentado con dieta alta en grasa saturada, el estrés oxidativo, al menos en el hígado, no está asociado a signos de síndrome metabólico. El extracto etanólico de Gobernadora mejora la capacidad antioxidante y reduce la peroxidación.

## **Parámetros biliares**

En relación a la composición lipídica de la bilis vesicular, la DG incrementa los fosfolípidos y el colesterol biliar, sin incrementar las sales biliares, lo que se traduce en un mayor porcentaje molar de colesterol, lo que hace más propenso el desarrollo de cálculos biliares (Castro-Torres et al., 2015). Los fosfolípidos no se modificaron con los tratamientos, mientras que el extracto de Gobernadora en la dieta grasa disminuye los ácidos biliares y el colesterol, lo que conduce a un porcentaje molar de colesterol más bajo, pero no diferente de la DG. Esto no es acorde con el reporte de la prevención de la litiasis de colesterol en el hámster (Arteaga et al., 2005b), lo cual puede ser debido a que con la dieta litogénica sin grasa usada en ese estudio, el colesterol biliar es mucho más elevado y, por ser la dieta sin grasa, los fosfolípidos son muy bajos, lo que conduce a un alto porcentaje molar de colesterol y a la formación de cálculos, lo cual no ocurre con la DG de nuestro estudio. Ezetimiba no modificó los parámetros alterados por la DG, lo cual difiere con el estudio en hámsteres con dieta grasa tratados con Ezetimiba (Valasek et al., 2008). La diferencia es probablemente debida a que en ese estudio la dieta grasa contenía un nivel 10 veces mayor de colesterol que el de nuestra dieta. En un estudio clínico se propuso a la Ezetimiba como un agente para la prevención y/o tratamiento de la litiasis biliar, pues redujo el colesterol plasmático y biliar, e indujo un retraso en la cristalización del colesterol en la bilis (Wang et al., 2008). Sin embargo, en otro estudio epidemiológico se concluyó que la Ezetimiba no parece influir en la prevalencia de litiasis (Stein et al., 2012).

El cambio de dieta grasa a dieta de Purina parece ser suficiente para reducir la concentración de colesterol biliar y bajar el porcentaje molar de colesterol. Ni Ezetimiba, ni el extracto de Gobernadora tienen un mayor efecto que el solo cambio de la dieta.

## **Esteroles fecales**

En un estudio anterior de este laboratorio (Arteaga et al., 2005b), se sugirió un probable efecto del extracto sobre la microbiota intestinal para explicar el cambio en el perfil de ácidos biliares, debido al extracto de Gobernadora en hámsteres con dieta inductora de cálculos biliares. El perfil de ácidos biliares en presencia de extracto de Gobernadora, cambia a uno con mayor proporción de ácidos biliares primarios y reducción de los secundarios, los cuales son producidos en el intestino por la microbiota y que entran en la circulación enterohepática (Arteaga et al., 2005b). El extracto etanólico de Gobernadora tiene propiedades antibióticas (Mabry et al., 1979; Argueta, 1994), que podrían haber modificado la microbiota intestinal. Quizás estos cambios en la microbiota pudieran afectar la absorción del colesterol. Por lo anterior, se utilizó Ezetimiba para comparar sus efectos con los del extracto de Gobernadora. La Ezetimiba, al inhibir la absorción del colesterol en el intestino, aumenta los esteroles neutros fecales y disminuye el colesterol y los triglicéridos plasmáticos (Valasek et al., 2008). Mientras que esto fue confirmado en el presente estudio, también se encontró que el extracto de Gobernadora no induce un aumento en los esteroles fecales.

En el caso de los animales de experimentación para determinar si presentan los parámetros del síndrome metabólico, como obesidad, dislipidemia, hiperinsulinemia y resistencia a insulina, generalmente se comparan los grupos experimentales con el grupo control. Esto complica las comparaciones entre diferentes estudios, por la especie, cepa, edad y género del modelo animal utilizado, los tiempos de exposición a las dietas y las mismas dietas. Tampoco existen criterios absolutos para identificar niveles patológicos de los parámetros como colesterol, triglicéridos o hipertensión. En cambio en los humanos, hay niveles estandarizados de los parámetros por las diferentes organizaciones que vigilan la epidemiología del síndrome metabólico a nivel mundial como la Federación Internacional de Diabetes y la OMS (Alberti et al., 2006).

### **Cambio de dieta grasa a dieta de mantenimiento**

El tratamiento de la diabetes y del síndrome metabólico en humanos incluye dieta, ejercicio y terapia farmacológica (Grundy et al., 2004b), por esta razón en este experimento fue estudiado el efecto del cambio de dieta grasa a una menos calórica como la estándar de mantenimiento (Purina), tanto sola como adicionada de extracto de Gobernadora. Varios parámetros disminuyeron con el solo cambio de dieta, tales como colesterol plasmático, leptina sérica, tamaño del hígado y lípidos totales hepáticos, así como sales biliares, colesterol y porcentaje molar de colesterol en bilis vesicular. Sin embargo, no se modificaron el grado de obesidad, medidos como peso corporal y grasa epididimal. La adición del extracto de Gobernadora a la dieta con Purina indujo una reducción de la obesidad, una mayor disminución en colesterol plasmático, insulina y leptina séricas, tamaño del hígado y peroxidación, además de elevar el colesterol HDL y la sensibilidad a la insulina. Lo anterior es consistente con la idea de que el cambio de hábitos alimentarios y un tratamiento farmacológico mejoran las alteraciones producidas por el síndrome metabólico. Así mismo muestran que el extracto de Gobernadora puede ser útil en el tratamiento no solo de la diabetes sino también del síndrome metabólico.

### **Conclusiones**

El extracto etanólico de Gobernadora en la dieta alta en grasa y con colesterol en hámsteres que ya han desarrollado algunos signos presentes en el síndrome metabólico, es el de reducirlos hacia niveles normales, tales como: los triglicéridos y el colesterol total plasmáticos, insulina y leptina séricas, mejorar la sensibilidad a la insulina, así como la obesidad, el tamaño del hígado, los lípidos totales hepáticos y el colesterol biliar. No modifica los triglicéridos y el colesterol en el hígado, tampoco el porcentaje molar de colesterol en bilis ni los esteroides fecales. Estos efectos también están asociados a un incremento en la capacidad antioxidante en el hígado. El cambio de dieta grasa a dieta de mantenimiento incrementa la peroxidación de lípidos, pero disminuye varios parámetros alterados por la dieta grasa, tales como colesterol plasmático, leptina sérica, tamaño del hígado, lípidos totales hepáticos y en bilis vesicular sales biliares, colesterol y porcentaje molar de colesterol. Aun así, el extracto de Gobernadora en el cambio de dieta grasa a dieta estándar induce una reducción en la obesidad, y una mayor disminución en colesterol plasmático, insulina y leptina séricas, tamaño del hígado y

peroxidación, además de elevar el colesterol HDL y la sensibilidad a la insulina. Por lo anterior, se requieren mas estudios preclínicos para establecer toxicidad y conocer los mecanismos de acción que harían que el extracto etanólico de Gobernadora pueda ser útil en el tratamiento del síndrome metabólico.

## **Perspectivas**

A partir de los resultados y discusiones de los experimentos presentados en este estudio, las perspectivas de trabajos futuros son las siguientes:

El ejercicio es una parte importante en el tratamiento del síndrome metabólico, al igual que modificación de la dieta (Grundy et al., 2004b). Ya se vio que el extracto de Gobernadora puede mejorar algunos parámetros aún más o quizás más rápido que con solo el cambio de dieta. Falta establecer si al combinar el extracto con el ejercicio puede ser más benéfico para tratar alteraciones del síndrome metabólico inducido por la dieta.

Se esperaba que el principio activo fuese el antioxidante presente en la resina de la Gobernadora, el NDGA. Sin embargo, al suministrarlo en la dieta no mostró efectos, a pesar de suministrarse en niveles superiores a su contenido en el extracto. Esto pudiera deberse a la forma de suministrarlo. Estudios previos mostraron efectos benéficos del NDGA en modelos de diabetes, en los cuales se suministró en forma oral forzada de una suspensión en carboximetilcelulosa (Luo et al., 1998, Reed et al., 1999). Por lo que hace falta probar este modo de suministro en nuestro modelo para descartar si es benéfico o inefectivo. Así mismo, Gnabre et al. (2015) mostró que los derivados O-metilados del NDGA, son menos tóxicos y más efectivos que el NDGA como antivirales y anticancerígenos, por lo que sería interesante poner a prueba a los derivados obtenidos de la metilación del NDGA en el síndrome metabólico.

De cualquier manera, es posible que el NDGA no sea el principio activo sino otro (s) compuesto. También es posible que al suministrarlo con el extracto, se incluyen también derivados O-metilados, que parecen ser los picos cercanos al pico del NDGA que aparecieron en el cromatograma, y/o otros compuestos que evitan su oxidación o tienen un efecto sinérgico o potencializador. Por lo anterior, se requiere fraccionar el extracto etanólico de Gobernadora, y ensayar las fracciones en el modelo.

Respecto al mecanismo de acción del extracto de Gobernadora, falta analizar modificaciones en factores transcripcionales como SREBP-1, 2 y PPAR- $\alpha$ , que podrían indicar cambios en lipogénesis, alteraciones en el metabolismo del colesterol u oxidación de ácidos grasos. También pueden analizarse cambios en la actividad de la AMPK, como ocurre en ratones con dieta grasa tratados con NDGA oral (Lee et al., 2010).

El modelo de hámster con dieta grasa puede ser útil para estudiar el efecto de extractos de otras plantas medicinales conocidas para tratar diabetes y síndrome metabólico.

## Literatura citada

- Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* 23,469-480
- Aragonés G., Ardid-Ruiz A., Ibars M., Suárez M., Bladé C.,(2016). Modulation of leptin resistance by food compounds., *Mol. Nutr. Food Res.* 00, 1–15
- Argueta, V. (1994). *Atlas of the Traditional Mexican Medicinal Plants, vol. II.* National Indigenous Institute, Mexico, 669–670
- Arredondo A., de Icaza E. (2009). Financial requirements for the treatment of diabetes in Latin America: implications for the health system and for patients in Mexico. *Diabetologia.* 52,1693-1695
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R. (2005a). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J. Ethnopharm.* 98, 231-239
- Arteaga, S., Carmona A., Luis, J., Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R. (2005b). Effect of *Larrea tridentata* (creosote bush) on cholesterol gallstones and bile secretion in hamsters. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1093-1099
- Bartlett G.R. (1959). Phosphorous Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468
- Basciano H., Federico L., Adeli K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr. Metab.* 2, 5
- Beigh, S.H., Jain, S. (2012). Prevalence of metabolic syndrome and gender differences. *Bioinformation* 8, 613-616
- Belmares, H., Barrera, A., Hernandez, F., Ramos, L.F., Castillo, E., Motomochi, A.B. (1981) Research and development of *Larrea tridentata* as a source of raw materials, in *Larrea*, eds. E. Campos Lopez, T.J. Mabry, S. Fernandez Tavizon (México, D.F.: CONACYT), 247-276
- Beltran-Sanchez, H., Harhay, M.O., Harhey, M.M., McElligott, S. (2013). Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010. *JACC* 62, 697-703
- Bravo, E., Cantafora, A., Calcabrini, A., Ortu, G. (1994). Why prefer the golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) to the Wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? *Comp. Biochem. Physiol.* 107n, 347-355
- Bremer A.A., Mietus-Snyder M., Lustig R.H. (2012). Toward a Unifying Hypothesis of Metabolic Syndrome. *Pediatrics.* 129, 557–570
- Brent, J. (1999). Three new herbal hepatotoxic syndromes. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 715–719
- Carlos Poston W.S., Foreyt J.P. (1999). Obesity is an environmental issue. *Atherosclerosis* 146, 201–209
- Castro-Torres I., Cárdenas-Vázquez R., Velázquez-González C., Ventura-Martínez R., De la O-Arciniega M., Naranjo-Rodríguez E. B., Martínez-Vázquez M. (2015). Future therapeutic targets for the treatment and prevention of cholesterol gallstones. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 366–374
- Cefalu, W.T. (2006). Animal Models of Type 2 Diabetes: Clinical Presentation and Pathophysiological Relevance to the Human Condition. *ILAR Journal* 47,186-198
- Chen G.C., Huang C.Y., Chang M.Y., Chen C.H., Chen S.W., Huang C.J., Chao P.M. (2011). Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metab Clin Experim.* 60: 155–164
- Combettes-Souverain M.M.J., Souidi M., Parquet M.A., Ferezou J.M.J., Riottot M.J., Serougne C.J., Lutton C.Y. (2002). The Syrian golden hamster strain LPN: a useful animal model for human cholelithiasis. *J Nutr Biochem* 13, 226-236

- Copps K.D., White M.F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55, 2565–2582
- Dam H. (1969). Nutritional aspects of gallstone formation with particular reference to alimentary production of gallstones in laboratory animals. *World Rev Nutr Diet* 11, 199-239
- Deshpande A.D., Harris-Hayes M., Schootman M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy* 88, 1254-1264
- DiBaise J.K., Frank D.N., Mathur R., (2012). Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts. *Am J Gastroenterol Suppl* 1, 22– 27
- Downum K.R., Dole J., Rodriguez E., (1988). Nordihydroguaiaretic acid: inter- and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 16, 551-555
- Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.* 365, 1415-1428
- Festi D., Schiumerini R., Eusebi L.H., Marasco G., Taddia M., Colecchia A., (2014). Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 20, 16079-16094
- Flores-Lázaro J.R., Rodríguez-Martínez E., Rivas-Arancibia S. (2011). Consecuencias metabólicas de la alteración funcional del tejido adiposo en el paciente con obesidad (*Metabolic consequences of the functional alterations of adipose tissue in obese patients*). *Revista Médica Del Hospital General de México* 74(3), 157-165
- Gajda A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A. (2007). Animal Lab News March <http://www.alnmag.com/articles/2008/04/diet-induced-metabolic-syndrome-rodent-models>
- Galleano, M., Calabro, V., Prince, P.D., Litterio, M.C., Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M.A., Miatello, R.M., Oteiza, P.I., Fraga, C.G. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1259, 87-94
- García-Rodríguez Y, Bravo-Monzón A., Martínez-Díaz Y., Torres-Gurrola G., Espinosa-García F.J.. (2012). Variación Fitoquímica Defensiva en Ecosistemas Terrestres, 217-252. En: J. C. Rojas y E. A. Malo (eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur. México. 446 p.
- Gisvold O., (1948). A preliminary survey of the occurrence of nordihydroguaiaretic acid in *Larrea divaricata*. *J. AM. Pharm Assoc.* 37, 194-196
- Gonzalez-Coloma A., Wisdom C.S., Rundel P.W., (1988). Ozone Impact on the Antioxidant Nordihydroguaiaretic Acid Content in the External Leaf Resin of *Larrea tridentata*. *Biochem. Syst. Ecol.* 16, 56-64
- Grundy S.M., Brewer H.B., Cleeman J.J., Smith S.C., Lenfant C. (2004a). for the Conference Participants, Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 109, 433-438
- Grundy S.M., Hansen B., Smith S.C., Cleeman J.J., Kahn R.A. (2004b). For the Conference Participants, Clinical Management of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Management. *Circulation* 109, 551-556
- Grundy S.M. (2004c). Cholesterol gallstones: a fellow traveler with metabolic syndrome?, *Am J Clin Nutr* 80, 1–2
- Gnabre, J., Bates, R., Huang, R.C. (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *J. Tradit. Complement Med.* 5, 119-126

- Gordon, D., Gayle, R., Hart, J., Sirota, R., Baker, A. (1995). Chaparral ingestion: the broadening spectrum of liver injury caused by herbal medications. *JAMA* 273, 489–490
- Haas, J.T., and Biddinger, S.B. (2009). Dissecting the Role of Insulin Resistance in the Metabolic Syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 206-210
- Hopps, E., Noto, D., Caimi, G., Averna, M.R. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 72-77
- Horton T.J., Gayles E.C., Prach P.A., Koppenhafer T.A., Pagliassotti M.J. (1997). Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 272, R1571-R1576
- Hsu, C.Y., Chan, Y.P., Chang, J. (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol. Res.* 40, 13-21
- Ibrahim, W., Lee, U.S., Yeh, C.C., Szabo, J., Bruckner, G., Chow, C.K. (1997). Oxidative Stress and Antioxidant Status in Mouse Liver: Effects of Dietary Lipid, Vitamin E and Iron. *J. Nutr.* 127, 1401–1406
- Inouye, L.S., and Lotufo, G.R. (2006). Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods. *Talanta* 70, 584–587
- Kasim-Karakas S.E., Vriend H., Almario R., Chow L.P., Goodman M.N. (1996). Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med* 128, 208-213
- Kaur J. (2014). A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*. Volume 2014, Article ID 943162, 21 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/943162>
- Konno, C., Lu, Z., Xue, H., Erdelmeier, C., Meksuriyen, D., Che, C., Cordell, G., Soejarto, D., Waller, D., Fong, H. (1990). Furanoid lignans from *Larrea tridentata*. *J. Nat. Prod.* 53, 396-406
- Lambert J.D., Zhao D., Meyers R.O., Kuester R.K., Timmermann B.N., Dorr R.T., (2002). Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. *Toxicol* 40, 1701-1708.
- Larqué C., Velasco M., Navarro-Tableros V., Duhne M., Aguirre J., Gutiérrez-Reyes G., Moreno J., Robles-Diaz G., Hong E., Hiriart M. (2011). Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models. *IUBMB Life*, 63(10), 831–839
- Lecker J.L., Matthan N.R., Billheimer J.T., Rader D.J., Lichtenstein A.H. (2010). Impact of Dietary Fat Type Within the Context of Altered Cholesterol Homeostasis on Cholesterol and Lipoprotein Metabolism in the F1B Hamster. *Metabolism* 59, 1491-1501
- Lee, M.S., Kim, D., Hwang, J.K. (2010). Nordihydroguaiaretic acid protects against high-fat diet-induced fatty liver by activating AMP-activated protein kinase in obese mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 92-97
- Lelliott C., Vidal-Puig A.J. (2004). Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int. J. Obes.* 28, S22-S28
- Lim S., Eckel R.H. (2014). Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 15, 329–341
- Luo, J., Chuang, T., Cheung, J., Quan, J., Tsai, J., Sullivan, C., Hector, R.F., Reed, M.J., Meszaros, K., King, S.R., Carlson, T.J., Reaven, G.M. (1998). Masoprocol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Eur. J. Pharmacol.* 346, 77-79
- Mabry, T., DiFeo, D., Sakakibara, M., Bohnstedt, C., Sleiger, D. (1977). The natural products chemistry of *Larrea*, in Creosote Bush. Biology and Chemistry of *Larrea* in the New World Desert, eds. J. Mabry, J. Hunziker, D. DiFeo. (USA: Dowden Hutchinson Ross Inc.), 115–134.

- Mabry, T., and Bohnstedt, Ch. (1981). *Larrea*: a chemical resource, in *Larrea*, eds. E. Campos Lopez, T.J. Mabry, S. Fernandez Tavizon (México, D.F.:CONACYT), 217- 235
- Márquez-Sandoval, F., Macedo-Ojeda, G., Viramontes-Hörner, D., Fernandez-Ballart, J.D., Salas-Salvado, J., Vizmanos, B. (2011). The prevalence of metabolic síndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr.* 14, 1702-1713
- Méndez-Sánchez N., Chavez-Tapia N.C., Motola-Kuba D., Sánchez-Lara K., Ponciano-Rodríguez G., Baptista H., H. Ramos M., Uribe M. (2005). Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease. *World. J. Gastroenterol.* 11, 1653-1657
- Méndez-Sánchez N., Zamora-Valdes D., Chavez-Tapia N.C., Uribe M. (2007). Role of diet in cholesterol gallstone formation. *Clin. Chim. Acta.* 376, 1-8
- Montiel Tafur M., Crowe T.K., Torres E. (2009). A review of *curanderismo* and healing practices among Mexicans and Mexican Americans. *Occup. Ther. Int.* 16, 82-88
- Moon, H.S., Dalamaga, M., Kim, S.Y., Polyzos, S.A., Hamnvik, O.P., Magkos, F., Paruthi, J., Mantzoros, C.S. (2013). Leptin's Role in Lipodystrophic and Nonlipodystrophic Insulin-Resistant and Diabetic Individuals. *Endocr. Rev.* 34, 377–412
- Morise A, Mouro J, Boué C, Combe N, Amsler G, Gripois D, Quignard-Boulangé A, Yvan-Charvet L, Fénart E, Weill P, Hermier D. (2006) Gender-related response of lipid metabolism to dietary fatty acids in the hámster. *Br. J. Nutr.* 95(4),709-20.
- Muraoka, T., Aoki, K., Iwasaki, T., Shinoda, K., Nakamra, A., Aburatani, H., Mori, S., Tokuyama, K., Kubota, N., Kadowaki, T., Terauchi, Y. (2011). Ezetimibe decreases SREBP-1c expression in liver and reverses hepatic insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Metab. Clin. Exp.* 60, 617–628
- Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, National Academy Press, Washington D.C. 3-10, 1995
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358
- Oron-Herman M., Kamari Y., Grossman E., Yeger G., Peleg E., Shabtay Z., Sharmis A., Sharabi Y. (2008). Metabolic Syndrome: Comparison of the Two Commonly Used Animal Models. *Am J Hypertension.* 21, 1018-1022
- Pagliassotti M.J., Prach P.A., Koppenhafer T.A., Pan D.A. (1996). Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am. J. Physiol.* 271, R1319-R1326
- Palacios R.A., Hunziker J.H., (1972). Observaciones sobre la taxonomía del género *Larrea* (Zygophyllaceae). *Darwiniana* T. 17, Volumen del Cincuentenario, 473-476
- Rasmussen H.E., Guderian Jr. D.M., Wray C.A., Dussault P.H., Schlegel V.L., Carr T.P. (2006). Reduction in Cholesterol Absorption Is Enhanced by Stearate-Enriched Plant Sterol Esters in Hamsters. *J. Nutr.* 136, 2722–2727
- Reaven G.M. (1988). Banting Lecture 1988. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes.* 37:1595-1607
- Reed, M.J., Meszaros, K., Entes, L.J., Claypool, M.D., Pinkett, J.G., Brignetti, D., Luo, J., Khandwala, A., Reaven, G.M. (1999). Effect of masoprocol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* 42, 102-106
- Richterich, R., and Colombo, J.P. (1981). *Clinical Chemistry, Theory, Practice and Interpretation*, John Wiley & Sons, 432-439
- Ríos, J.M., Mangione, A.M., Gianello, J.C., (2008). Effects of natural phenolic compounds from a desert dominant shrub *Larrea divaricata* Cav. on toxicity and survival in mice. *Revista Chilena de Historia Natural* 81, 293-302

- Rojas R., Aguilar Salinas C.A., Jimenez Corona A., Shamah Levy T., Rauda J., Ávila Burgos L., Villalpando S., Lazcano Ponce E. (2010). Metabolic syndrome in Mexican adults. Results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex* 52 suppl 1, S11-S18
- Romo de Vivar, A. (1985). *Natural Products of the Mexican Flora*. Limusa, México, 56 pp.
- Roskar, I., Strukelj, B., Lundre, M. (2016). Screening of phenolic compounds reveals inhibitory activity of nordihydroguaiaretic acid against three enzymes involved in the regulation of blood glucose level. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71, 88-89
- Scribner, K.A., Gadbois, T.M., Gowri, M., Azhar, S., Reaven, G.M. (2000). Masoprocol Decreases Serum Triglyceride Concentrations in Rats With Fructose-Induced Hypertriglyceridemia. *Metabolism* 49, 1106-1110
- Sharma, O.P., and Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202–1205
- Sheikh, N., Philen, R., Love, L. (1997). Chaparral-associated hepatotoxicity. *Arch. Intern. Med.* 157, 913–919
- Sørensen T.I.A, Virtue S., Vidal-Puig A. (2010). Obesity as a clinical and public health problem: Is there a need for a new definition based on lipotoxicity effects? *Biochim. Biophys. Acta.* 1801, 400-404
- Stein A., Hermoni D., Elis A., Konikoff F.M. (2012) Effect of ezetimibe on the prevalence of cholelithiasis. *World J Gastroenterol.* 18(40), 5789-5792
- Suchy D., Labuzek K., Stadnicki A., Okopien B. (2011). Ezetimibe-a new approach in hypercholesterolemia management, *Pharmacol. Rep.* 63, 1335-1348
- Taghibiglou C., Carpentier A., Van Inderstine S.C., Chen B., Rudy D., Aiton A., Lewis G.F., Adeli K. (2000). Mechanisms of Hepatic Very Low Density Lipoprotein Overproduction in Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* 275, 8416-8425
- Tappy L., Le K.A. (2010). Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiol Rev.* 90: 23-46
- Timmermann, B.N. (1981). *Larrea*: potential uses, in *Larrea*, eds. E. Campos López, T.J. Mabry, S. Fernández Tavizón (México, D.F.: CONACYT), 237-245
- Torres-Villalobos G., Hamdan-Perez N., Tovar A.R., Ordaz-Nava G., Martínez-Benitez B., Torre-Villalvazo I., Morán-Ramos S., Díaz-Villaseñor A., Noriega L.G., Hiriart M., Medina-Santillán R., Castillo-Hernández M.C., Méndez-Sánchez N., Uribe M., Torres N. (2015). Combined high-fat diet and sustained high sucrose consumption promotes NAFLD in a murine model. *Ann. Hepatol.* 14, 540-546
- Turley S.D., Dietschy J.M. (1978). Re-evaluation of the 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J. Lipid. Res.* 19, 924-928
- Tyler V.E., (1994). *The honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies*. Pharmaceutical Products Press, New York, New York, USA. 375 pp.
- Ulman E.A., Ricci M.R., *Animal Lab News* 4(6) September/October 2005. <http://www.alnmag.com/articles/2008/04/laboratory-animal-diets-critical-part-your-vivo-research>
- Unger, R.H., Clak, G.O., Scherer, P.E., Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1801, 209-214
- van Heek, M., Austin, T.M., Farley, C., Cook, J.A., Tetzloff, G.G., Davis, H.R. (2001). Ezetimibe, a Potent Cholesterol Absorption Inhibitor, Normalizes Combined Dyslipidemia in Obese Hyperinsulinemic Hamsters. *Diabetes* 50, 1330–1335
- Valasek, M.A., Repa, J.J., Quan, G., Dietschy, J.M., Turley, S.D. (2008). Inhibiting intestinal NPC1L1 activity prevents diet-induced increase in biliary cholesterol in Golden Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G813–G822

- Varga O., Harangi M., Olsson I.A.S., Hansen A.K., (2010). Contribution of animal models to the understanding of the metabolic syndrome: a systematic overview. *Obes. Rev.* 11, 792-807
- Vázquez-Yanes, C., Batis Muñoz, A.I., Alcocer Silva, M.I., Gual Díaz, M., Sánchez Dirzo, C. (1999). *Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084.* CONABIO-Instituto de Ecología, (Mexico:UNAM), 263-266
- Verástegui M.A., Sánchez C.A., Heredia N.L., Santos García-Alvarado J., (1996). Antimicrobial activity of extracts of three mayor plants from the Chihuahuan desert. *J Ethnopharm* 52, 175-177
- Wang P.R., Guo Q., Ippolito M., Wu M., Milot D., Ventre J., Doebber T., Wright S.D., Chao Y.S., (2001). High fat fed hamster, a unique animal model for treatment of diabetic dyslipidemia with peroxisome proliferator activated receptor alpha selective agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 427, 285-293
- Wang H.H., Portincasa P., Mendez-Sanchez N., Uribe M., Wang D.Q.-H., (2008). Effect of Ezetimibe on the Prevention and Dissolution of Cholesterol Gallstones. *Gastroenterology.* 134, 2101–2110
- Wang, S.H., Lee, K.T., Ker, C.G. (2010). Leptin in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 16, 5801-5809
- Winkelman, M. (1989). Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. *Med. Anthropol.* 11, 255-268
- Xue, H., Lu, Z., Konno, C., Soejarto, D., Cordell, G., Fong, H., Hodgson, W. (1988). 3 $\beta$ -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 $\beta$ -(4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27, 233–235
- Zagayko, A., Kravchenko, G., Strelchenko, K., Shkapo, A., Briukhanova, T. (2015). Chapter 2: Sex and Age Differences in Lipoprotein Metabolism Proatherogenic Changes under the Experimental Metabolic Syndrome in Hamsters in *Lipoproteins - From Bench to Bedside*, eds. G. Kostner and I. Chennamesetty (InTech), 17-58.
- Zhang, B.B., Zhou, G., Li, C. (2009a). AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 9, 407-416.
- Zhang, Z., Wang, H., Jiao, R., Peng, C., Wong, Y.M., Yeung, V.S.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y. (2009b). Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 921-930
- Zhang, H., Li, Y., Hu, J., Shen, W-J., Singh, M., Hou, X., Bittner, A., Bittner, S., Cortez, Y., Tabassun, J., Kraemer, F.B., Azhar, S. (2015) Effect of creosote bush-derived NDGA on expression of genes involved in lipid metabolism in liver of high-fructose fed rats: Relevance to NDGA amelioration of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis. *PLoS ONE* 10(9): e0138203.
- Zimmet P., Boyko E.J., Collier G.R., de Courten M., (1999). Etiology of the Metabolic Syndrome: Potential Role of Insulin Resistance, Leptin Resistance, and Other Players. *Ann N Y Acad Sci.* 892, 25-44

## Apéndice I. Resumen de un experimento preliminar con NDGA en dieta alta en grasa

**Objetivo:** Ensayar el efecto del NDGA sobre algunos parámetros relacionados con el síndrome metabólico inducidos con dieta purificada alta en manteca de cerdo.

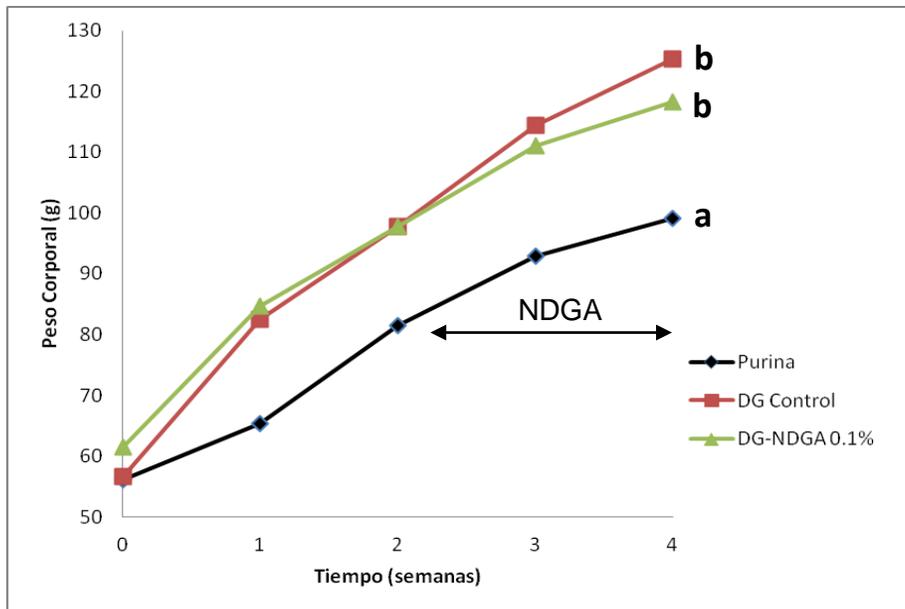
**Metodología general:** La composición de la dieta estudiada se muestra en la **Tabla 1**. La dieta de Purina-Manteca consiste de la dieta de ingredientes naturales de mantenimiento de roedores (Nutricubos Purina) adicionada de manteca de cerdo y otros componentes para no desbalancearla nutricionalmente.

Se montaron 3 grupos de 7 hámsteres machos de 5 semanas de edad y un peso promedio inicial de 75g. Un grupo recibió solo Nutricubos Purina por 4 semanas, los otros dos grupos recibieron Purina con manteca de cerdo (dieta grasa) durante las primeras 2 semanas (Tabla 1). En las semanas 3a y 4ª, uno de los 2 grupos continuo recibiendo la dieta de purina con manteca, mientras el otro recibió la dieta grasa adicionada con NDGA al nivel de 0.1 % que fue disuelto en 10ml de etanol antes de adicionarse a la Purina y por último se adicionaron los demás componentes.

### Resultados

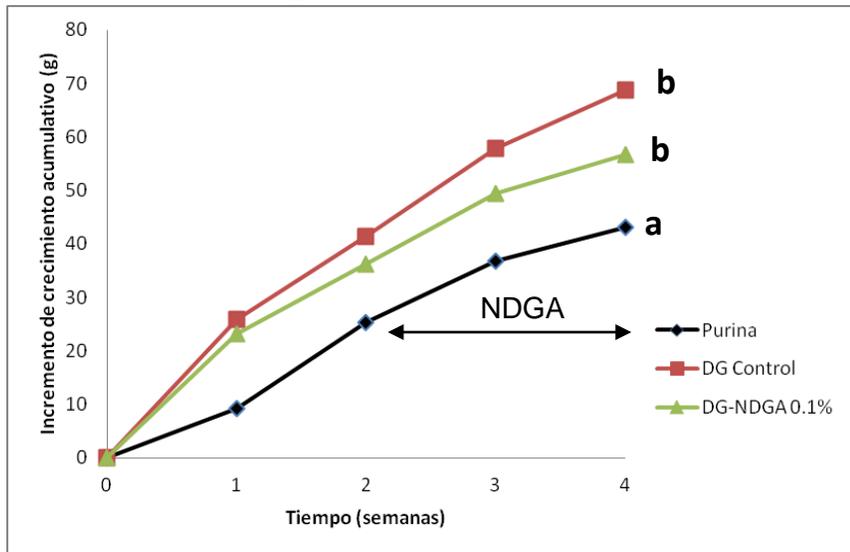
#### Peso corporal y consumo de alimento

El peso corporal final después de 4 semanas con las dietas (**Figura 1**) presentó diferencias significativas entre los grupos. Se observa que los machos con dieta de purina control se separan de los demás grupos desde la primera hasta la cuarta semana. Sin embargo, los grupos con dieta grasa y dieta grasa con NDGA no difieren entre sí desde la primera semana.



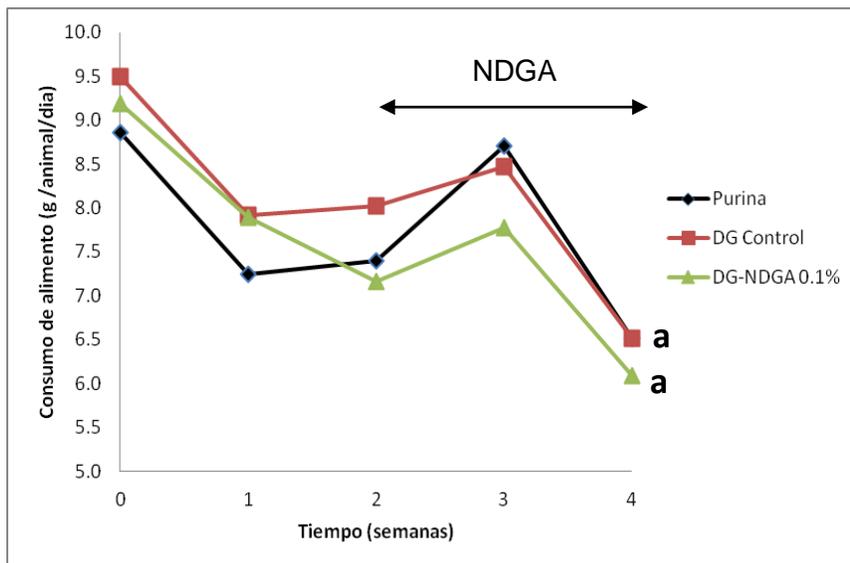
**Figura 1. Curva de crecimiento** de hámsteres durante 4 semanas con dietas no purificadas y una dosis de NDGA. En la cuarta semana, diferente letra indica diferencia significativa entre grupos. ( $P < 0.05$ ; ANOVA y Tukey).

En las curvas de incremento de crecimiento (**Figura 2**), presentó diferencias significativas entre los grupos. Al igual que en peso corporal, se observa que los machos con dieta de purina control se separan de los demás grupos desde la primera hasta la cuarta semana. Sin embargo, los grupos con dieta grasa y dieta grasa con NDGA no difieren entre si desde la primera semana.



**Figura 2. Curvas de incremento de crecimiento acumulativo** de hámsteres durante 4 semanas con dietas no purificadas y una dosis de NDGA. En la cuarta semana, diferente letra indica diferencia significativa entre grupos. ( $P < 0.05$ ; ANOVA y Tukey).

En el consumo de alimento (**Figura 3**), no hubo diferencias significativas entre los grupos con las diferentes dietas desde la primera a la cuarta semana.



**Figura 3. Consumo de alimento promedio** de hámsteres durante 4 semanas con dietas no purificadas y una dosis de NDGA. Diferente letra indica diferencia significativa entre grupos. ( $P < 0.05$ ; ANOVA y Tukey).

## Parámetros plasmáticos

Al final del periodo de tratamiento con las dietas experimentales hubo diferencias significativas en los parámetros plasmáticos analizados entre los grupos y tratamientos (**Tabla 2**). La glucosa y el colesterol total fueron significativamente mayores en los grupos que recibieron dieta grasa sola y con NDGA, así como los triglicéridos en este último grupo. No hubo diferencias en el colesterol HDL entre los grupos.

**Tabla 2. Glucosa y lípidos plasmáticos.\***

Grupos y Dietas	Glucosa (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)	Colesterol total (mg/dl)	% Colesterol HDL
Purina n = 7	177 ± 25 <sub>a</sub>	136 ± 40 <sub>a</sub>	81 ± 7 <sub>a</sub>	77 ± 7 <sub>a</sub>
1. Dieta grasa (DG) n = 7	223 ± 26 <sub>b</sub>	202 ± 99 <sub>a,b</sub>	121 ± 13 <sub>b</sub>	66 ± 9 <sub>a</sub>

\* Media ± DS

Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05; ANOVA y Tukey)

## Parámetros hepáticos

A las 4 semanas con dietas (**Tabla 3**) y después de recibir una dosis de NDGA en la dieta durante 2 semanas, los grupos con DG sola y con NDGA mostraron los valores más elevados en peso absoluto y porcentual del hígado, sin diferencias significativas entre ellos. Lo mismo se observó en relación a la grasa epididimal.

**Tabla 3. Tamaño del hígado y depósitos de grasa epididimal.\***

Grupos y Dietas	Hígado (g)	Hígado (% p. c.)	Grasa Epididimal (g)	% Grasa Epididimal
Purina n = 7	4.3 ± 0.4 <sub>a</sub>	4.4 ± 0.3 <sub>a</sub>	0.98 ± 0.19 <sub>a</sub>	0.99 ± 0.13 <sub>a</sub>
1. Dieta grasa (DG) n = 7	6.9 ± 0.6 <sub>b</sub>	5.5 ± 0.4 <sub>b</sub>	1.74 ± 0.17 <sub>b</sub>	1.39 ± 0.12 <sub>b</sub>
2. DG + NDGA 0.1% n = 7	6.9 ± 0.5 <sub>b</sub>	5.9 ± 0.3 <sub>b</sub>	1.67 ± 0.30 <sub>b</sub>	1.41 ± 0.21 <sub>b</sub>

\* Media ± DS

Diferente letra en la misma columna indica diferencia significativa entre grupos (P<0.05; ANOVA y Tukey).

## Conclusión

El NDGA adicionado a la dieta grasa al nivel de 0.1% no tuvo ningún efecto sobre los parámetros analizados y relacionados con el síndrome metabólico, inducidos por la dieta grasa.



# Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Improves Insulin Sensitivity and Reduces Plasma and Hepatic Lipids in Hamsters Fed a High Fat and Cholesterol Diet

Georgina Del Vecchio-Tenorio<sup>1</sup>, Maricela Rodríguez-Cruz<sup>2</sup>, Adolfo Andrade-Cetto<sup>3</sup> and René Cárdenas-Vázquez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Animal Experimental, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup> Laboratorio de Nutrición Molecular, Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup> Laboratorio de Etnofarmacología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Thomas Efforth,  
University of Mainz, Germany

### Reviewed by:

Victor Kueto,  
University of Dschang, Cameroon  
Benedict Green,  
U.S. Department of Agriculture, USA

### \*Correspondence:

René Cárdenas-Vázquez  
rcv@ciencias.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Ethnopharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 27 February 2016

**Accepted:** 17 June 2016

**Published:** 28 June 2016

### Citation:

Del Vecchio-Tenorio G,  
Rodríguez-Cruz M, Andrade-Cetto A  
and Cárdenas-Vázquez R (2016)  
Creosote Bush (*Larrea tridentata*)  
Improves Insulin Sensitivity  
and Reduces Plasma and Hepatic  
Lipids in Hamsters Fed a High Fat  
and Cholesterol Diet.  
Front. Pharmacol. 7:194.  
doi: 10.3389/fphar.2016.00194

Creosote bush, *Larrea tridentata* (Sesse y Moc. Ex DC, Zygophyllaceae) is a shrub found in the deserts of Northern Mexico and Southwestern United States. In traditional medicine, it is used to treat a variety of illnesses including type 2 diabetes. The present study aims to investigate the effects of creosote bush ethanolic extract on plasma and liver parameters associated with the metabolic syndrome in hamsters fed a high fat and cholesterol diet (HFD), comparing them with those induced by ezetimibe (EZ). Seven groups of six hamsters each were formed. Six groups were fed HFD for 2 weeks. The following 2 weeks, the HFD groups received: (1) only HFD, (2) HFD + 3 mg% EZ, (3) HFD + 0.2% creosote bush ethanolic extract, (4) only standard diet (Std Diet), (5) Std Diet + 3 mg% EZ, (6) Std Diet + 0.2% creosote bush ethanolic extract. The beneficial effects of creosote bush ethanolic extract in the HFD hamster model were a reduction of insulin resistance, associated with lower serum insulin and leptin, lower hepatic lipid peroxidation and higher liver antioxidant capacity. Plasma and liver lipids tended or were reduced to values closer to those of animals fed standard diet. A similar effect on lipids was induced by EZ, although with even lower hepatic cholesterol and total lipids concentrations. In general, the change from HFD to standard diet plus ethanolic extract induced the same but deeper changes, including a reduction in plasma glucose and an increase in the percentage of HDL cholesterol. Unlike creosote bush extract, EZ increased food consumption and neutral fecal steroids, with no significant effect on body weight, epididymal fat pads, liver peroxidation or antioxidant capacity. Also EZ did not modify serum insulin and leptin. However, insulin sensitivity improved to values similar to those induced by the extract. This suggests that the mechanism of action of creosote bush ethanolic extract is different to inhibition of cholesterol absorption or increase excretion. The ethanolic extract of *L. tridentata* could be useful in the treatment of the metabolic syndrome.

**Keywords:** *Larrea tridentata*, cholesterol, hamster, high fat diet, insulin tolerance

## INTRODUCTION

Creosote bush, *Larrea tridentata* (Sesse y Moc. Ex DC, Zygophyllaceae) is a shrub found in the deserts of Northern Mexico and Southwestern United States. The resin that covers the leaves contains flavonoid aglycones, as well as several lignans, notably including the antioxidant NDGA (Konno et al., 1990). Other lignans present are the linear ones, guaiaretic acid and meso-dihydroguaiaretic acid, and the cyclolignans, norisoguaiaicin and its 3 methyl derivative (Gnabre et al., 2015). *L. tridentata* contains about 0.1% of dry weight as volatile oils, mainly monoterpenoids and aromatic sesquiterpenoids (Mabry and Bohnstedt, 1981; Xue et al., 1988). The ethanol extraction of leaves and twigs of *L. tridentata*, at room temperature, yields 10% resin in a dry weight basis, containing 26% NDGA (Belmares et al., 1981).

Creosote bush is used to treat a variety of illnesses including type 2 diabetes. Oral decoctions and extracts of leaves and twigs have been used by the Pima Indians in the United States and in Mexico for the treatment of diabetes (Winkelman, 1989). Additionally, it has been reported that NDGA reduces plasma glucose and TGs in rats treated with streptozotocin (Luo et al., 1998; Reed et al., 1999); it also reduces TG secretion and liver TG content in rats with fructose-induced hypertriglyceridemia (Scribner et al., 2000) and inhibits dipeptidyl peptidase 4 (Roskar et al., 2016). Many of the pharmacological activities of *L. tridentata* have been ascribed to its lignans, although many other components are present in the extract that could be synergizing or potentiating its activities. Thorough reviews dealing with the medicinal uses and phytochemistry of creosote bush and NDGA are available (Arteaga et al., 2005; Gnabre et al., 2015).

A risk factor for developing type 2 diabetes and cardiovascular disease, is the MS. Central obesity and insulin resistance are acknowledged as important causative factors. According to the IDF (Alberti et al., 2006), MS includes central obesity and two of the following factors: decreased HDL cholesterol, elevated TGs, high blood pressure and raised fasting glucose. Hyperleptinemia, due to leptin resistance, may also be an important etiological component of the MS (Wang et al., 2010). Persons with MS are predispose to develop fatty liver and its complications (Wang et al., 2010).

Since MS is a group of metabolic abnormalities that recently have been characterized, it is difficult to find in the Mexican traditional medicine plants specifically used for its treatment. However, creosote bush is used to control hyperglycemia and hyperlipidemia, two key factors of the MS (Winkelman, 1989).

The aim of the present work was to study the effects of creosote bush ethanolic extract on the Syrian golden hamster fed a high fat and cholesterol diet that expresses some components of the MS, in order to determine its possible use in the treatment of this alteration. Since change of life style, mainly diet and exercise, is recommended for treatment of MS in humans, the effect of changing high fat diet to maintenance diet with or without

creosote bush ethanolic extract was tested. It was expected that the change of diet plus extract could induce higher improvement of the altered parameters.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Extract

The plants of *L. tridentata* used to prepare the ethanolic extract were collected at San Luis Potosi State, Mexico. Voucher specimens were deposited at the National Herbarium, Institute of Biology, UNAM (MEXU; no. 534807) and at the Herbarium of Medicinal Plants, S. XXI Medical Center (IMSS; nos 11 319–11 321).

The ethanolic extract was prepared from 100 g of coarsely fragmented leaves and twigs, extracted in 1 L absolute ethanol, mixed for 30 min at room temperature, filtered with paper and reduced to approximately 40 mL in a rotary evaporator under reduced pressure and then lyophilized. The ratio of the herbal drug to the herbal drug preparation (DER native) was 10:1.

### NDGA Content in the Ethanolic Extract

For the HPLC analysis, an Agilent 1260 Infinity system with diode array detector and a Macherey–Nagel 100-5 C18 (250 mm × 4.6 mm) column were employed, with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.04 M and acetonitrile (ACN) mixtures as mobile phase, at a flow rate of 1.5 mL/min and 20 µL sample volume injection. Initially a relation of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ACN 70:30 (v/v) was started, with ACN concentration being increased up to 50% by minute 15. Then ACN was increased again, so that a relation of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ACN 30:70 (v/v) was reached by minute 19. Finally, mobile phase was returned to an ACN proportion of 30% by minute 21. NDGA (Sigma–Aldrich) and creosote bush ethanolic extract were dissolved in methanol. An NDGA standard curve was made in the range 20–80 µg/mL, following absorbance at 280 nm. As shown in the chromatogram (Figure 1), the creosote bush extract contains NDGA (8.9%), together with several other peaks, which could be *O*-methylated derivatives that have been reported in creosote bush (Gnabre et al., 2015).

### Animals and Diets

Thirty-six male Syrian hamsters, 5-week-old, weighing 72 g were obtained from the stock colony kept at the animal house from the Faculty of Sciences, UNAM, Mexico, were fed *ad libitum* with a HFD containing standard rodent chow (Std diet: Purina Nutricubes; 3.39 kcal/g) 70%, casein 6.9%, cellulose 1.5%, lard 20%, methionine 0.12%, choline 0.042%, AIN-93M Mineral Mix 1.05%, AIN-93Vitamin Mix 0.3% and cholesterol 0.1%. The energy content was 4.46 kcal/g diet. The control group ( $n = 6$ ) was fed with the standard rodent chow. After 2 weeks, the hamsters on HFD were randomly divided in six groups of six animals each with average similar body weight and fed the following diets and water *ad libitum*: (1) HFD; (2) HFD with added ezetimibe (EZ; Zient, Schering-Plough) at 3 mg% as a positive control; (3) HFD added with creosote bush ethanolic extract at 0.2%; (4) standard rodent chow (Std diet); (5) Std diet

**Abbreviation:** HFD, high fat diet; IDF, International Diabetes Federation; MS, metabolic syndrome; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; TG, triglycerides.

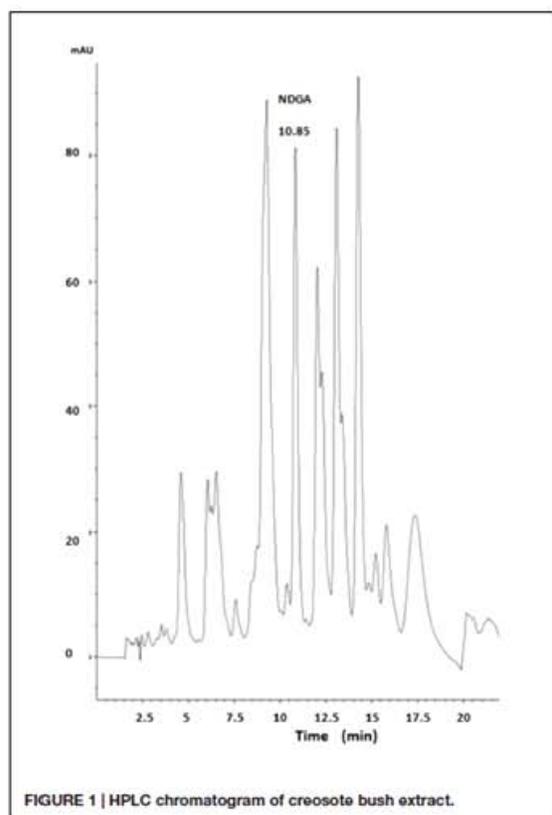


FIGURE 1 | HPLC chromatogram of creosote bush extract.

added with creosote bush ethanolic extract at 0.2%, and (6) Std diet with 3 mg% EZ. The level of extract included in the HFD diet was based upon the result of a preliminary experiment indicating a higher and more consistent effect on plasmatic lipids than with a lower one (0.1%). A higher level (0.25%) was equally effective. EZ was chosen as a positive control at 3 mg% of diet (~2 mg/kg b.w.), since it had been reported that this dose is effective in normalizing the combined dyslipidemia induced by high fat diet in male hamsters (van Heek et al., 2001). Each group was housed in a stainless steel cage with sawdust bedding, at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , under a 14:10 h light–dark cycle. Food consumption was measured every other day.

The animals were handled according to the Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Office of animal care and use of the National Institute of Health, 1996). All methods used in this study were approved by the Internal Council of the Facultad de Ciencias of the Universidad Nacional Autónoma de México.

### Blood and Tissues Sample Collection

At the end of the fourth week the animals were fasted for 4 h, anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg b.w. i.p.) and blood samples were taken from the retro-orbital sinus with

heparinized and non-heparinized capillary tubes. An insulin tolerance test was then performed as shown below. After the insulin tolerance test, the animals were euthanized with a pentobarbital overdose. The liver and epididymal fat depots were dissected, weighed and frozen at  $-40^\circ\text{C}$ . Plasma and serum was obtained by centrifugation on a hematocrit centrifuge and kept at  $-40^\circ\text{C}$ .

### Plasma and Serum Analysis

Plasma glucose, TGs, total cholesterol, and HDL cholesterol were determined with enzymatic-colorimetric assay kits (SpinReact, Girona, Spain). Insulin and leptin serum concentrations were determined by ELISA Kits (Millipore Rat/Mouse Insulin, Rat Leptin).

### Insulin Tolerance Test

Under anesthesia the insulin tolerance test (ITT) was performed with an insulin injection (i.p.) at a dose of 0.2 IU/100 g body weight, blood from the retro-orbital sinus was sampled at 0, 5, 10, and 15 min after insulin injection. Plasma glucose was determined with an enzymatic-colorimetric assay kit, as above.

### Liver Parameters

A liver sample was homogenized in a Dounce apparatus with methanol:chloroform (1:1) and centrifuged at  $1000 \times g$  for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant samples were evaporated under vacuum and total lipids measured by the phospho-vanillin method (Inouye and Lotufo, 2006), TGs and cholesterol by enzymatic colorimetric assays (SpinReact, Girona, Spain).

A 10% liver homogenate in saline was prepared and centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . Liver peroxidation was determined by Thiobarbituric Acid Reactive Substances method (TBARS; Ohkawa et al., 1979) and antioxidant capacity by DPPH assay (Hsu et al., 2007; Sharma and Bhat, 2009) in the homogenate supernatant.

### Neutral Fecal Sterols

The neutral fecal sterols were extracted with chloroform:methanol:saline (2:1:0.75) from samples of 72 h feces collected at the end of the second week of treatments. Feces were dried, powdered and homogenized. Sterols were determined in the dried organic phase by the Lieberman–Burchard reaction (Richterich and Colombo, 1981), with cholesterol as standard.

### Statistical Analyses

Statistical analyses and graphics were performed with GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All data are reported as mean  $\pm$  SD for the specified number of samples. Differences between mean values were tested for statistical significance ( $P < 0.05$ ) by 1-way ANOVA. Tukey HSD was used as *post hoc* test. Pearson correlation was performed between body weight and epididymal fat depots.

## RESULTS

### Body Weight, Epididymal Fat Depots, and Food Consumption

After the first 2 weeks on HFD, six groups of similar body weight were formed. Although these groups had higher body weight, it was not significantly different from that of the Std diet fed group (Table 1). After 4 weeks, significant ( $P < 0.05$ ) differences in body weight among groups were found. Animals on HFD were significantly heavier than those on Std diet. Groups with EZ, creosote bush ethanolic extract and those changed from HFD to Std diet with or without EZ were not significantly different from the heaviest HFD group nor from the lighter one that receiving only Std diet for 4 weeks. The group changed from HFD to Std diet with extract exhibited a significantly ( $P < 0.05$ ) lower body weight than that of the HFD group and very similar to the one fed Std diet for 4 weeks. Epididymal fat depots followed the same pattern, except that the lighter group was the one that changed to Std diet added with extract. A significant correlation was found between body weight and epididymal fat weight ( $r = 0.8$ ,  $n = 42$ ,  $P < 0.001$ ).

In relation to food consumption, there were significant differences among groups. The lowest food consumption among the groups with HFD for the last 2 weeks was the one with HFD and *L. tridentata* extract, but consumption was not significantly different from the groups fed either HFD or Std diet for 4 weeks. The change from HFD to Std diet did not differ in food consumption from those with Std for 4 weeks nor the one with HFD. The change to Std diet plus extract induced a significantly higher consumption than the change to Std diet without additions. The group that changed from HFD to Std diet and EZ exhibited the significantly highest food consumption of all groups ( $P < 0.05$ ).

### Plasma Parameters

At the end of the treatment period, there were significant differences in plasma parameters among groups (Figure 2). Glucose was not significantly different among groups fed only Std diet or HFD with or without any addition. Also, no differences were found among the three groups changed to Std diet. However, addition of EZ or creosote bush extract induced lower

glucose concentrations in the groups changed to Std diet when compared with Std diet and HFD controls ( $P < 0.05$ ).

In TGs, no significant difference was found between Std diet and HFD control groups. The addition of EZ and extract to HFD lower this parameter ( $P < 0.05$ ). The change to Std diet with or without additions did not significantly altered TGs. Total cholesterol was higher in HFD control group ( $P < 0.05$ ). Both EZ and extract additions to HFD induced lower concentration than those of the HFD and Std diet controls. The change to Std diet return cholesterol level to Std diet control concentrations. Creosote bush extract in the Std diet significantly reduced cholesterol, whereas EZ addition did not when were compared with the group on HFD changed to Std diet.

In relation to HDL cholesterol, groups with HFD, except the one with EZ, exhibited higher values than the Std diet control group. The change to Std diet reduced HDL cholesterol to values significantly ( $P < 0.05$ ) different from the HFD control group. Addition of EZ or extract to the Std diet had no effect on HDL cholesterol, when compared with the group that change to Std diet.

### Serum Insulin and Leptin

As shown in Figure 3, there were increments in both insulin and leptin serum concentrations in groups fed with HFD and HFD plus EZ. Added to HFD, the ethanolic extract reduced leptin and insulin to values significantly ( $P < 0.05$ ) different from those obtained with HFD.

The change from HFD to Std diet reduced leptin but not insulin concentration. Addition of EZ did not induce a significant reduction of any of the two hormones from the concentrations found in the HFD group. The change to Std diet added with ethanolic extract induced the lowest levels of leptin and insulin of all groups, although they were not significantly different from those found in the group with Std diet for 4 weeks.

### Insulin Tolerance Test

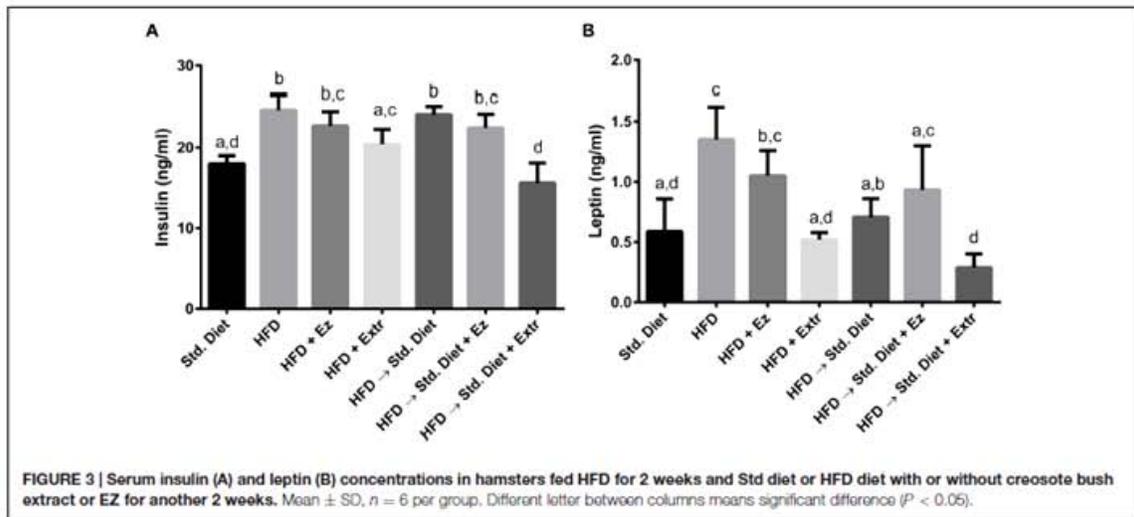
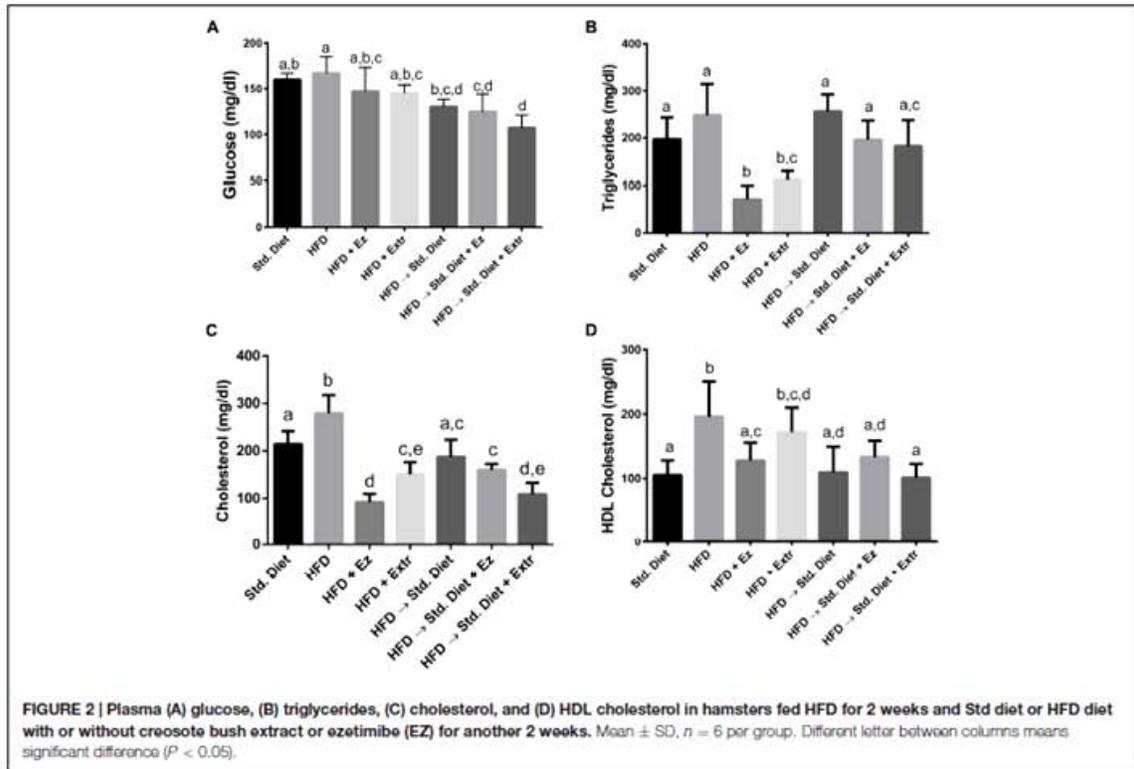
There were significant differences in the sensitivity to an insulin injection, expressed as the percentage reduction of the initial glucose concentration per minute (Table 2). The HFD group showed the lowest sensitivity to insulin. The additions of ethanolic extract of creosote bush or EZ to the HFD induced

TABLE 1 | Body weight and food consumption in hamsters\*.

Groups and diets	Body weight (g) at 2 weeks	Body weight (g) at 4 weeks	Epididymal fat pads (g)	Food consumption (g/animal/day) <sup>†</sup>
Std. diet (4 weeks)	97.2 ± 7.2 <sup>A</sup>	111.3 ± 9.7 <sup>A</sup>	1.43 ± 0.29 <sup>A,C</sup>	7.9 ± 1.0 <sup>A,D</sup>
HFD (4 weeks)	100.8 ± 10.5 <sup>A</sup>	133.5 ± 10.5 <sup>D</sup>	1.90 ± 0.28 <sup>D</sup>	8.5 ± 0.3 <sup>A,D,E</sup>
HFD + 3mg% ezetimibe	109.2 ± 7.4 <sup>A</sup>	126.5 ± 11.0 <sup>A,D</sup>	1.88 ± 0.25 <sup>A,D</sup>	9.2 ± 0.5 <sup>A,D</sup>
HFD + 0.2% ethanolic extract	109.0 ± 8.9 <sup>A</sup>	119.7 ± 10.4 <sup>A,D</sup>	1.43 ± 0.18 <sup>A,C</sup>	6.8 ± 0.8 <sup>D</sup>
HFD→Std. diet	108.8 ± 6.0 <sup>A</sup>	120.2 ± 5.5 <sup>A,D</sup>	1.50 ± 0.18 <sup>A,D,C</sup>	7.9 ± 0.4 <sup>A,D</sup>
HFD→Std. diet + 3 mg% ezetimibe	108.8 ± 10.8 <sup>A</sup>	125.0 ± 14.0 <sup>A,D</sup>	1.67 ± 0.35 <sup>A,D</sup>	14.1 ± 2.2 <sup>C</sup>
HFD→Std. diet + 0.2% ethanolic extract	108.8 ± 11.3 <sup>A</sup>	112.2 ± 10.5 <sup>A</sup>	1.06 ± 0.22 <sup>C</sup>	9.8 ± 1.6 <sup>D</sup>

\*Mean ± SD,  $n = 6$  per group. Different letter in the same column indicate a statistical difference ( $P < 0.05$ ; ANOVA and Tukey).

<sup>†</sup>Food consumption on last 2 weeks,  $n = 8$  per group.



significant ( $P < 0.05$ ) increases in insulin sensitivity, which were not different from the group fed Std diet. The change from HFD to Std diet similarly increased the sensitivity to insulin to an intermediate value that was not different from that of the control

group receiving Std diet for 4 weeks. The change from HFD to Std diet added with EZ further increased sensitivity to a value not significantly different from either the control group fed Std diet for 4 weeks or the group changed to Std diet. The highest

**TABLE 2 | Insulin tolerance test in hamsters fed HFD and experimental diets.**

Groups and diets	% Glucose decrease/min*
Std. diet (4 weeks)	4.58 ± 2.19 <sup>A,C</sup>
HFD (4 weeks)	0.65 ± 1.82 <sup>D</sup>
HFD + 3 mg% Ezetimibe	2.46 ± 0.41 <sup>A,D</sup>
HFD + 0.2% ethanolic extract	2.09 ± 0.96 <sup>A,B</sup>
HFD → Std. diet	2.55 ± 1.02 <sup>A,E</sup>
HFD → Std. diet + 3 mg% Ezetimibe	3.86 ± 0.76 <sup>A,C,E</sup>
HFD → Std. diet + 0.2% ethanolic extract	5.96 ± 0.66 <sup>F</sup>

\*Mean ± SD, n = 4 per group. Different letter means significant difference (P < 0.05).

sensitivity to insulin was induced by the change from HFD to Std diet added with ethanolic extract, to a value different from that of the group changed to Std diet (P < 0.05).

### Liver Weight and Lipids

In relation to liver weight (Figure 4A), the group with HFD showed the highest values in absolute and percent liver weight, being different from the group with only Std diet (P < 0.05). The addition of EZ to HFD reduced liver weight to control values (P < 0.05). Liver weight from animals on HFD and creosote bush extract were lower, but did not significantly differ from the ones on HFD. The change from HFD to Std diet for 2 weeks did not significantly reduced liver weight. However, addition of EZ or extract returned liver weight to control values (Std diet group).

Total lipids (Figure 4B) were highest in the group on HFD. EZ decreased (P < 0.05) this parameter to control levels, whereas extract, although significantly reduced total lipids, did not reach control values. The change from HFD to Std diet also decrease total lipids to levels that did not significantly differ from control levels. Addition of EZ or extract to Std diet, although showed lower total lipids, were not significantly different from only Std diet. With cholesterol (Figure 4C) similar changes occurred, i.e., HFD induced higher concentration that were lowered by EZ, but the extract did not reach a significant difference with the HFD group. The change to Std diet without additions significantly reduced liver cholesterol concentrations, but none of the two additions made a significant difference from control. Hepatic TGs (Figure 4D) were higher with HFD and with HFD and EZ, respect to Std diet. Extract addition induced TG levels that also were not different from those with only HFD, however, values were neither significantly different from those in the group with only Std diet. The change to Std diet with or without addition returned TG levels to control (Std diet) concentrations.

### Liver Peroxidation and Antioxidant Capacity

As seen in Figure 5, unexpectedly, TBARS were twice as high in the control group than in the HFD one (P < 0.05). The group with HFD added with EZ, although with higher concentrations, did not statistically differ from the one on

HFD. The addition of extract induced the lowest concentrations, although not significantly different from those in the HFD group. The change to Std diet induce again high TBARS to levels similar to Std diet for 4 weeks. Addition of EZ did not reduced TBARS, whereas extract addition significantly lowered this parameter.

Antioxidant capacity measured as delayed oxidation of DPPH, was not significantly different in control, HFD and HFD with EZ groups, only the one with addition of extract statistically (P < 0.05) increased the liver antioxidant capacity. The change to Std diet showed high values of antioxidant capacity that were not modified by EZ or extract additions, but neither were statistically different from control nor HFD values.

### Neutral Fecal Sterols

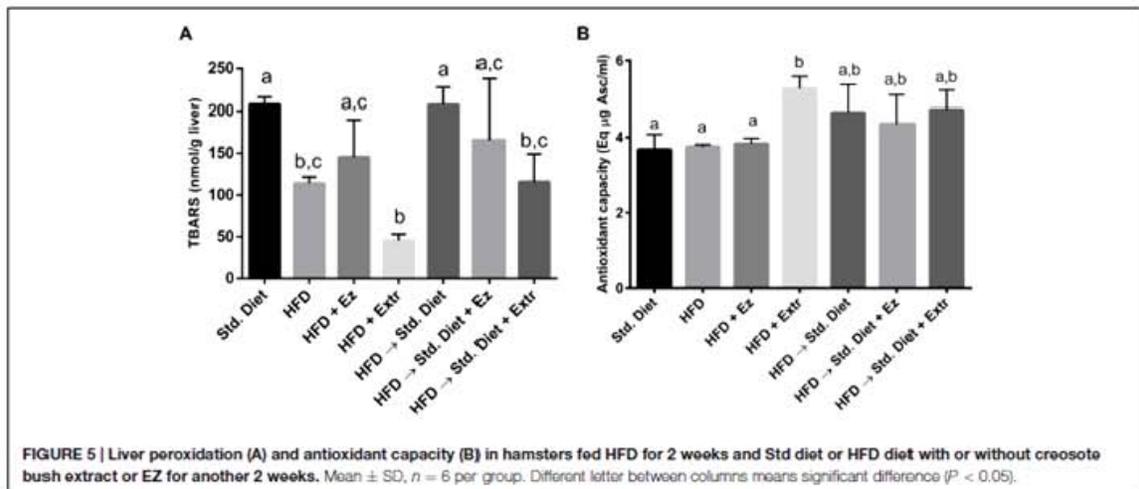
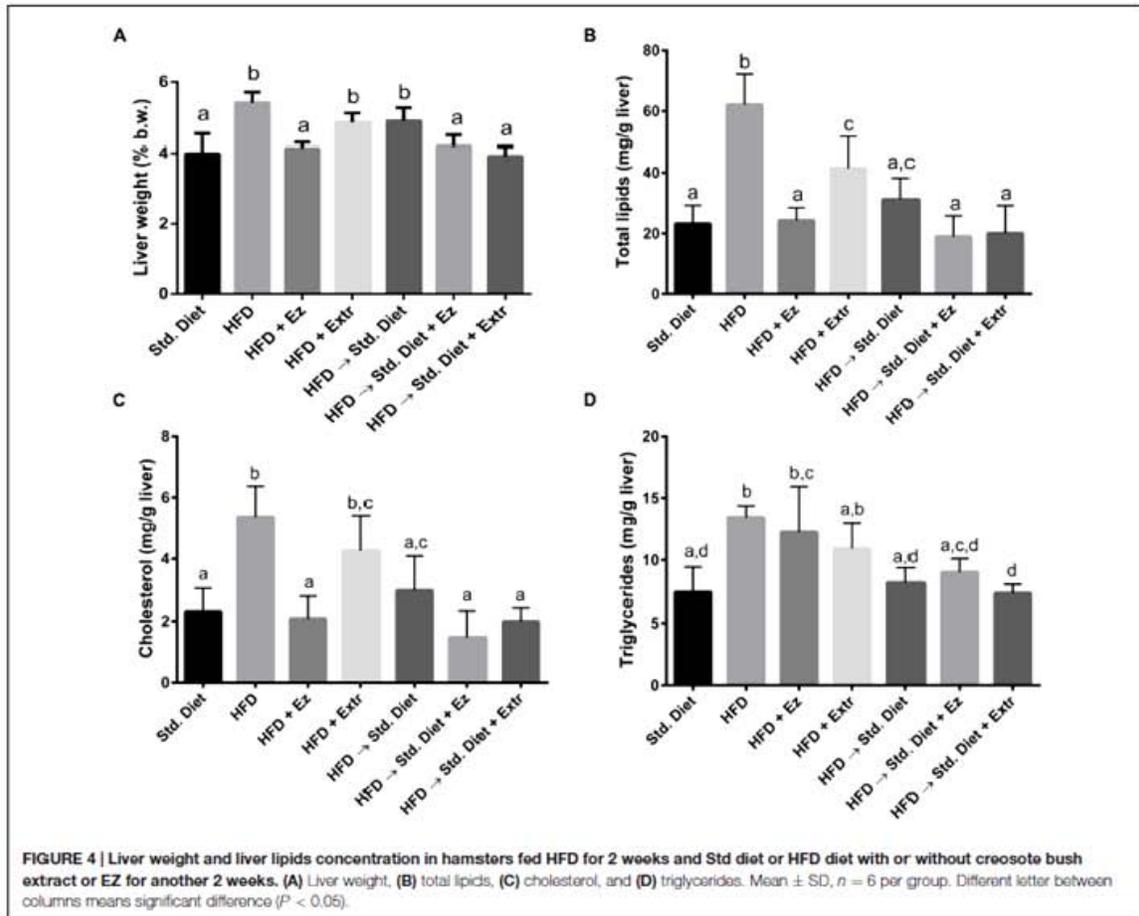
As shown in Figure 6, there was a significant (P < 0.05) increase in neutral fecal sterols in the groups with EZ, when compare with their own controls (HFD and HFD → Std diet groups). In the groups that received extract, fecal sterols were not significantly different from their own controls, which indicates that the extract effect is not related to a reduction of intestinal cholesterol absorption or increased excretion.

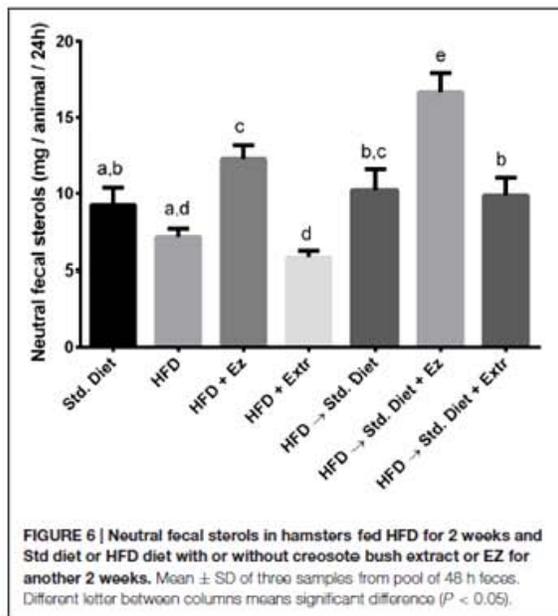
## DISCUSSION

The Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*) has a cholesterol and lipoprotein metabolism similar to that of humans (Bravo et al., 1994). This characteristic makes it an excellent model for studies on dyslipidemia and hypercholesterolemia, because changes in plasma lipids can be induced by specific dietary formulations, like the high fat and cholesterol diet (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008; Zhang Z. et al., 2009). The present study also shows that a diet based on lard and cholesterol is effective in inducing some of the MS parameters, such as increased body weight, high plasma and hepatic lipids and low sensitivity to insulin. In general, the addition of creosote bush ethanolic extract to the HFD decreases plasma and hepatic lipids, increases the sensitivity to insulin and normalizes plasma insulin and leptin levels.

In humans, prevalence of MS is slightly higher in women than in men (Marquez-Sandoval et al., 2011; Beigh and Jain, 2012; Beltran-Sanchez et al., 2013). In the present study, only males were used, since the response to high fat diet is more pronounced in males than in females, with higher plasma total cholesterol and TG (Morise et al., 2006). In another study, hamsters of different sex and age were fed a high-calorie diet, dyslipidemia developed in males, irrespective of age, whereas in females only developed with aging (Zagayko et al., 2015). Nonetheless, it remains to be established whether the extract of *L. tridentata* has the same effects in females as in males.

Since the treatment of type 2 diabetes and MS in humans usually involves diet, exercise, and pharmacological therapy, in the present study the further effect of creosote bush extract on the change to a less caloric diet, such as maintenance diet, was analyzed. Several parameters, such as body weight, epididymal fat depots, plasma cholesterol, insulin, leptin, sensitivity to





insulin, percent liver weight and peroxidation exhibited a further significant improvement with the change of diet and the addition of extract, in a 2 weeks treatment period, than with only a change to a less caloric diet, as the Std diet.

After 2 weeks of treatments, food consumption was similar among groups. The exception was the one fed Std diet with EZ, that exhibited the highest consumption of all, but despite that, it showed a body weight similar to that of the HFD animals. The epididymal fat pads, which reflect body adiposity, increased in hamsters fed HFD. EZ had no effect in this parameter, as previously published in hamsters (van Heek et al., 2001). The addition of creosote bush ethanolic extract to the HFD or to the Std Diet, induced the lowest body weight and adiposity of all groups, but not significantly different from the control group with Std diet for 4 weeks. The creosote bush ethanolic extract could have reduced nutrient absorption or accelerated the metabolism, since these groups gained less weight despite similar food consumption. In the short term this seems a beneficial effect, however, in the long term these could be a toxic one, also considering that excessive use of creosote bush can lead to hepatic and renal toxicity (Gordon et al., 1995; Sheikh et al., 1997).

Both EZ and creosote bush extract reduce plasma TGs and cholesterol, when added to the HFD. This shows a beneficial effect of the extract on components of the MS. A similar result on TGs was reported to be induced by Masoprocol (NDGA) in streptozotocin treated diabetic rats (Reed et al., 1999). EZ has previously been reported to reduce both parameters in hamsters on a high fat and cholesterol diet (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008). HDL cholesterol was reduced by EZ in the HFD, as reported by van Heek et al. (2001), but not by the extract.

The change to Std diet with or without additions, also decreases cholesterol, particularly with extract addition. In relation to TGs, the change to Std diet had no effect, and EZ or extract did not reduce this parameter significantly. The differential effect of extract and EZ when added to HFD and Std diet after HFD, may be due to differences in the type of lipids between diets, rather than in the quantity, since the fat content of the Std diet was 3.4%, according to a proximal chemical analysis. Whatever the reason, the Std diet used induced a high TG concentration.

Other characteristics of the MS are hyperinsulinemia, hyperleptinemia, and insulin resistance. These three parameters were present in the hamsters fed the HFD. The main physiological cause for leptin hypersecretion is diet-induced expansion of adipocytes. Circulating leptin levels are directly proportional to the amount of body energy stores. As energy storage capacity in adipocytes is exceeded during the period between the onset of overweight/obesity and the start of the MS, leptin resistance develops (Moon et al., 2013). This lack of action leads to overfeeding and generalized steatosis and lipotoxicity that leads to insulin resistance (Unger et al., 2010). The creosote bush ethanolic extract added to the HFD decreased serum leptin and insulin to normal values and insulin sensitivity to levels not different from animals with Std diet. The change from HFD to Std diet did not affect serum insulin, but leptin was reduced. The addition of extract to Std diet decreases both hormones to normal levels, as when added to the HFD. These effects could be related to lower weight gain and lower adiposity, as shown by low epididymal fat pads in both groups with extract, but not due to lower food consumption. Several phenolic compounds, such as resveratrol, oleuropein, and myricetin, as well as some precursors or derivatives of phenols, such as polydatin, have been found to reduce the level of circulating leptin in a large range of *in vivo* studies, using different types of models (Aragónes et al., 2016). In addition to phenolic compounds, other plant secondary metabolites, such as isothiocyanates and some terpenoids including thymol, saponins, and lycopenes among others, have also been shown to be effective in reducing leptin levels when administered to rodents (Aragónes et al., 2016). The mechanisms of action of these compounds have not been established for the majority of them. Resveratrol increases AMPK activity, reducing lipogenesis and increasing lipid oxidation (Zhang B.B. et al., 2009). Others, like some coumarins, flavonoids and polyphenols from fruit juices, could act as PPAR agonists or even improve leptin transport through the brain blood barrier (Aragónes et al., 2016), enhancing the oxidation of surplus fatty acids and reducing lipotoxicity (Unger et al., 2010). It remains to be established how creosote bush extract, probably through NDGA, reduces leptin resistance and improves insulin sensitivity. EZ had no significant effect in leptin and insulin, as reported by van Heek et al. (2001), although insulin sensitivity did improve.

The HFD increased liver size and lipids as previously published (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008). In our study, liver weight and lipids did not significantly decrease in hamsters fed HFD added with creosote bush ethanolic extract, except for total lipids. However, lower values were observed in TGs and cholesterol, with hepatic TGs concentration not

different from the level in animals on Std diet. Zhang et al. (2015) reported a decrease in hepatic TGs with NDGA, the main metabolite of creosote bush, in rats with a high fructose diet. EZ at the level used was more effective in decreasing liver weight, total lipids and cholesterol, a result that agrees with previous reports in hamster (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008). The change from HFD to Std diet, with or without added EZ or extract, was enough to return liver parameters to control values, although the lowest values were those with the addition of extract or EZ.

Oxidative stress has been implicated in the development of MS and type 2 diabetes (Hopps et al., 2010). Since the main metabolite of the extract is NDGA, a recognized antioxidant, peroxidation and antioxidant capacity in the liver were analyzed. Liver peroxidation, estimated as TBARS, was higher with the Std diet than with the HFD, while antioxidant capacity was similar with both diets. This TBARS reduction with the HFD may be due to differences in type of lipids between diets. In mice fed a diet with 8% fish oil, which contains highly unsaturated fatty acids, a significantly higher hepatic concentrations of TBARS was found than with 10% lard (Ibrahim et al., 1997). This indicates that in the HFD fed hamster, oxidative stress, at least in the liver, is not associated with signs of the MS.

As expected, creosote bush ethanolic extract decreased peroxidation with HFD and with the change to Std diet, and increased antioxidant capacity with HFD. EZ had no effect on these parameters, and it is known that its mechanism of action is through inhibiting cholesterol absorption (van Heek et al., 2001; Valasek et al., 2008). According to this, neutral fecal sterols were increased by EZ in the present work. Creosote bush ethanolic extract has been reported to have antibiotic actions (Mabry et al., 1979; Argueta, 1994), which could have modified intestinal microbiota. However, it does not affect cholesterol absorption as indicated by neutral fecal sterols.

At least one active principle of creosote bush ethanolic extract must be NDGA, which in the present study was found to constitute 8.9% of our ethanolic extract. Belmares et al. (1981) have reported that NDGA was 26% of ethanol extract of leaves and twigs. The difference with our analysis may be due to the methodology used. Belmares group employed gas chromatography of trimethylsilyl derivatives, so that besides NDGA, also several *O*-methylated derivatives, such as guaiaretic acid, present in the extract were accounted for as NDGA. Components of the extract include other lignans and flavonoids (Timmermann, 1981; Vázquez-Yanes et al., 1999; Gnabre et al., 2015). During many years, the beneficial effects of flavonoids on health were ascribed to their antioxidant capacity. They can also improve dyslipidemia by modulating lipid absorption and

lipogenesis (Galleano et al., 2012). It remains to be established whether the “agua de uso” from creosote bush traditionally used in diabetes treatment exerts the same effects as the ethanolic extract. Our results and those of Zhang et al. (2015) with fructose fed rats and NDGA, suggest that creosote bush derivatives also have potential utility in the treatment of MS.

## CONCLUSION

The beneficial effects of creosote bush ethanolic extract in the HFD hamster model that develops some signs of the MS are to reduce plasma TGs, total cholesterol, insulin and leptin, and improve insulin sensitivity. These effects are associated with a lower lipid peroxidation and an increase in antioxidant capacity in the liver. When the HFD diet is changed to Std diet, plasma glucose and cholesterol, serum leptin, insulin sensitivity and liver lipids improve. The addition of creosote bush ethanolic extract to Std diet, further reduces body and epididymal fat pads weight, plasma glucose and cholesterol, serum insulin and leptin, liver weight and peroxidation, also increasing sensitivity to insulin. This suggests that the ethanolic extract of *L. tridentata* could be useful in the treatment of the MS.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GD and RC-V performed experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. MR-C performed experiments and amended the paper. AA-C amended the paper.

## FUNDING

Funding for this project came from the Universidad Nacional Autónoma de México. GD would like to thank to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for supporting her Ph.D. studies and to CONACYT for a scholarship during her studies.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Sonia Escandón Rivera for analysis of creosote bush extract, M. en C. Agustín Carmona, Biol. Dora Salazar, Biol. Isabel Antúnez and MVZ Mario Soriano for housing and maintenance of the animals at the Animal Facility at the Faculty of Sciences, UNAM.

## REFERENCES

- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., and Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet. Med.* 23, 469–480. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x
- Aragonés, G., Ardid-Ruiz, A., Ibars, M., Suárez, M., and Bladé, C. (2016). Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* doi: 10.1002/mnfr.201500964 [Epub ahead of print].
- Argueta, V. (1994). *Atlas of the Traditional Mexican Medicinal Plants*, Vol. II. Mexico: National Indigenous Institute, 669–670.
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., and Cárdenas, R. (2005). *L. tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J. Ethnopharm.* 98, 231–239. doi: 10.1016/j.jep.2005.02.002
- Beigh, S. H., and Jain, S. (2012). Prevalence of metabolic syndrome and gender differences. *Bioinformation* 8, 613–616. doi: 10.6026/97320630008613

- Belmares, H., Barrera, A., Hernandez, F., Ramos, L. F., Castillo, E., and Motomochi, A. B. (1981). "Research and development of *L. tridentata* as a source of raw materials," in *Larrea*, eds E. Campos Lopez, T. J. Mabry, and S. Fernandez Tavizon (Mexico: CONACYT), 247–276.
- Beltran-Sanchez, H., Harhay, M. O., Harhey, M. M., and McElligott, S. (2013). Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999–2010. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 697–703. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.064
- Bravo, E., Cantafora, A., Calcabrini, A., and Ortu, G. (1994). Why prefer the golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) to the Wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 347–355.
- Galleano, M., Calabro, V., Prince, P. D., Litterio, M. C., Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M. A., et al. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1259, 87–94. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06511.x
- Gnabre, J., Bates, R., and Huang, R. C. (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: perspectives on combination therapy. *J. Tradit. Complement. Med.* 5, 119–126. doi: 10.1016/j.jtcme.2014.11.024
- Gordon, D., Gayle, R., Hart, J., Sirota, R., and Baker, A. (1995). Chaparral ingestion: the broadening spectrum of liver injury caused by herbal medications. *JAMA* 273, 489–490. doi: 10.1001/jama.273.6.489
- Hopps, E., Noto, D., Caimi, G., and Averna, M. R. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 72–77. doi: 10.1016/j.numecd.2009.06.002
- Hsu, C. Y., Chan, Y. P., and Chang, J. (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol. Res.* 40, 13–21. doi: 10.4067/S0716-97602007000100002
- Ibrahim, W., Lee, U. S., Yeh, C. C., Szabo, J., Bruckner, G., and Chow, C. K. (1997). Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *J. Nutr.* 127, 1401–1406.
- Inouye, L. S., and Lotufo, G. R. (2006). Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods. *Talanta* 70, 584–587. doi: 10.1016/j.talanta.2006.01.024
- Konno, C., Lu, Z., Xue, H., Erdelmeier, C., Meksuriyen, D., Che, C., et al. (1990). Furanoid lignans from *L. tridentata*. *J. Nat. Prod.* 53, 396–406. doi: 10.1021/np50068a019
- Luo, J., Chuang, T., Cheung, J., Quan, J., Tsai, I., Sullivan, C., et al. (1998). Masoprolol (nordihydroguaiaretic acid): a new antihyperglycemic agent isolated from the creosote bush (*L. tridentata*). *Eur. J. Pharmacol.* 346, 77–79. doi: 10.1016/S0014-2999(98)00139-3
- Mabry, J. T., and Bohnstedt, F. C. (1981). "Larrea: a chemical resource," in *Larrea*, eds E. Campos Lopez, T. J. Mabry, and S. Fernandez Tavizon (Mexico: CONACYT), 217–235.
- Mabry, T., DiFeo, D., Sakakibara, M., Bohnstedt, C., and Sleiger, D. (1979). "The natural products chemistry of *L.*" in *Creosote Bush: Biology and Chemistry of L. in the New World Desert*, eds J. Mabry, J. Hunziker, and D. DiFeo (Stroudsburg, PA: Dowden Hutchinson Ross Inc.), 115–134.
- Marquez-Sandoval, F., Macedo-Ojeda, G., Viramontes-Hörner, D., Fernandez-Ballart, J. D., Salas-Salvado, J., and Vizmanos, B. (2011). The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr.* 14, 1702–1713. doi: 10.1017/S1368898010003320
- Moon, H. S., Dalamaga, M., Kim, S. Y., Polyzos, S. A., Hamnvik, O. P., Magkos, F., et al. (2013). Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr. Rev.* 34, 377–412. doi: 10.1210/er.2012-1053
- Morise, A., Mouro, J., Boué, C., Combe, N., Amsler, G., Grippo, D., et al. (2006). Gender-related response of lipid metabolism to dietary fatty acids in the hamster. *Br. J. Nutr.* 95, 709–720. doi: 10.1079/BJN20051721
- Office of animal care and use of the National Institute of Health (1996). *Office of Animal Care and Use of the National Institute of Health, USA*. Available at: <http://oacu.od.nih.gov/regs> (accessed November, 2015).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Reed, M. J., Meszaros, K., Entes, L. J., Claypool, M. D., Pinkett, J. G., Brignetti, D., et al. (1999). Effect of masoprolol on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of Type II diabetes. *Diabetologia* 42, 102–106. doi: 10.1007/s001250051121
- Richterich, R., and Colombo, J. P. (1981). *Clinical Chemistry, Theory, Practice and Interpretation*. Chichester: John Wiley & Sons, 432–439.
- Roskar, L., Strukelj, B., and Lunder, M. (2016). Screening of phenolic compounds reveals inhibitory activity of nordihydroguaiaretic acid against three enzymes involved in the regulation of blood glucose level. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71, 88–89. doi: 10.1007/s11130-016-0530-0
- Scribner, K. A., Gadbois, T. M., Gowri, M., Azhar, S., and Reaven, G. M. (2000). Masoprolol decreases serum triglyceride concentrations in rats with fructose-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism* 49, 1106–1110. doi: 10.1053/meta.2000.8604
- Sharma, O. P., and Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202–1205. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- Sheikh, N., Philen, R. M., and Love, L. A. (1997). Chaparral-associated hepatotoxicity. *Arch. Intern. Med.* 157, 913–919. doi: 10.1016/S1096-2190(98)00026-2
- Timmermann, B. N. (1981). "L.: potential uses," in *Larrea*, eds E. Campos Lopez, T. J. Mabry, and S. Fernandez Tavizon (Mexico: CONACYT), 237–245.
- Unger, R. H., Clak, G. O., Scherer, P. E., and Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 209–214. doi: 10.1016/j.bbali.2009.10.006
- Valasek, M. A., Repa, J. J., Quan, G., Dietschy, J. M., and Turley, S. D. (2008). Inhibiting intestinal NPC1L1 activity prevents diet-induced increase in biliary cholesterol in Golden Syrian hamsters. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G813–G822. doi: 10.1152/ajpgi.90372.2008
- van Heek, M., Austin, T. M., Farley, C., Cook, J. A., Tetzloff, G. G., and Davis, H. R. (2001). Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, normalizes combined dyslipidemia in obese hyperinsulinemic hamsters. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 50, 1330–1335.
- Vázquez-Yanes, C., Batis Muñoz, A. I., Alcocer Silva, M. I., Gual Díaz, M., and Sánchez Dirzo, C. (1999). *Árboles y Arbustos Potencialmente Valiosos Para la Restauración Ecológica y la Reforestación. Reporte Técnico del Proyecto J084. CONABIO-Instituto de Ecología (Mexico: UNAM)*, 263–266.
- Wang, S. H., Lee, K. T., and Ker, C. G. (2010). Leptin in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 16, 5801–5809. doi: 10.3748/wjg.v16.i46.5801
- Winkelman, M. (1989). Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. *Med. Anthropol.* 11, 255–268. doi: 10.1080/01459740.1989.9965997
- Xue, H., Lu, Z., Konno, C., Soejarto, D., Cordell, G., Fong, H., et al. (1988). 3 $\beta$ -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 $\beta$ -(4-hydroxycinnamoyl)-erythrodiol from *L. tridentata*. *Phytochemistry* 27, 233–235. doi: 10.1016/0031-9422(88)80621-6
- Zagayko, A., Kravchenko, G., Strelchenko, K., Shkapo, A., and Briukhanova, T. (2015). "Sex and age differences in lipoprotein metabolism proatherogenic changes under the experimental metabolic syndrome in hamsters," in *Lipoproteins - From Bench to Bedside*, eds G. Kostner and I. Chennamesetty (Croatia: InTech), 17–58.
- Zhang, B. B., Zhou, G., and Li, C. (2009). AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 9, 407–416. doi: 10.1016/j.cmet.2009.03.012
- Zhang, H., Li, Y., Hu, J., Shen, W.-J., Singh, M., Hou, X., et al. (2015). Effect of creosote bush-derived NDGA on expression of genes involved in lipid metabolism in liver of high-fructose fed rats: relevance to NDGA amelioration of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis. *PLoS ONE* 10:e0138203. doi: 10.1371/journal.pone.0138203
- Zhang, Z., Wang, H., Jiao, R., Peng, C., Wong, Y. M., Yeung, V. S. Y., et al. (2009). Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 921–930. doi: 10.1002/mnfr.200800517

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Del Vecchio-Tenorio, Rodríguez-Cruz, Andrade-Cetto and Cárdenas-Vázquez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.