



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

ACTIVIDAD DE LA PARAOXONASA 1 (PON-1) EN RATONES CD-1,
ALIMENTADOS CON UNA DIETA ATEROGÉNICA, Y SUPLEMENTADOS POR
VÍA INTRAGÁSTRICA CON JUGO FRESCO DE GRANADA ROJA
(*Punica granatum* L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:
EDUARDO MARTÍNEZ HINOJOSA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
Licenciatura en Biología

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **EDUARDO MARTÍNEZ HINOJOSA**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis intitulado **"Actividad de la Paraoxonasa 1 (PON1) en ratones CD-1 alimentados con una dieta aterogénica y suplementados por vía intragástrica con jugo fresco de granada roja (*Punica granatum* L.)"**, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Quím. Blanca Estela Pérez Escandón

PRIMER VOCAL: Dra. Katia A. González Rodríguez

SEGUNDO VOCAL: M. en C. Mario Segura Almaráz

TERCER VOCAL: Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

SECRETARIO: Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto

PRIMER SUPLENTE: Dr. William Scott Monks Sheets

SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Ma. del Carmen González Rodríguez

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 26 de marzo de 2014

M. en C. Miguel Ángel Cabral Perdomo
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



c.c.p. Archivo



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2532, Fax 2109
cabralma@uah.edu.mx mcabralperdomo@gmail.com



DEDICATORIA

El presente trabajo te lo dedico a ti mamá (Francisca Martínez Hinojosa) como una muestra de mi amor y agradecimiento.

Dios puso en ti el cariño para tan noble misión, te dio el valor suficiente, el coraje de luchar y te agradezco por ello. Gracias por ser padre y madre y no rendirte ante las adversidades, gracias por tus cuidados, por tu gran amor que se mantiene a pesar de los años, gracias por tu humildad, por tus principios e integridad, porque me enseñaste con tus acciones y me llenaste con tus bendiciones. Yo sé que no me alcanza las palabras para agradecerte todo, todo lo que has hecho por mí, pero este pequeño logro te lo dedico con todo mi amor.

“Una persona usualmente se convierte en aquello que cree que es. Si yo sigo diciéndome a mí mismo que no puedo hacer algo, es posible que yo termine siendo incapaz de hacerlo. Por el contrario, si yo tengo la creencia de que sí puedo hacerlo, con seguridad, yo adquiriré la capacidad de realizarlo aunque no la haya tenido al principio” (Gandhi).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera, por aceptarme como su alumno, gracias por apoyarme, por sus consejos, su paciencia, tiempo y confianza que invirtió en mí.

A los M. en C. Diego Estrada Luna e Iván F. Celaya Correa, quienes con sus consejos, recomendaciones y comentarios, hicieron posible la realización de esta Tesis.

Al L.N. Fernando Chimal Cazares, por su enorme apoyo en la enseñanza en la manipulación de animales utilizados para llevar a cabo este trabajo, gracias.

A cada uno de los integrantes de mi comité de tesis:

Quím. Blanca Estela Pérez Escandón

Dr. Miguel Ángel Villavicencio Nieto

Dra. Katia A. González Rodríguez

M. en C. Mario Segura Almaráz

Dr. William Scott Monks Sheets

M. en C. María del Carmen González Rodríguez

Por aceptar revisar mi trabajo, donde tuve presente la aportación de sus conocimientos y sus valiosas sugerencias que contribuyeron directamente a la culminación de este trabajo, les agradezco por su tiempo y paciencia que invirtieron en ayudarme a resolver mis dudas.

A mis compañeros y amigos: Diana Romero, Emma Rodríguez, Germán Manzanero, Jair Beltrán, Itzel Godínez, Javier López, Manuel Revilla, Viridiana Mendoza y Yadira Cervantes, les agradezco por su amistad sincera que va más allá de un simple apoyo y compañía.

A mi familia, en especial a mi hermano Alfredo, mis tías Matilde y Celia, mis primas Adriana, Alma y Eva Elena por su enorme apoyo, gracias.

Por último, en mi necesidad en dar **gracias** a algo más allá de mi percepción, me lleva a agradecer a “aquello” que originó el infinito universo y el misterio que acontece la vida misma, y eso para mí, es lo que la humanidad llama **dios**, un ser omnipotente.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
I.1.1. Antioxidantes no enzimáticos	13
I.1.2. Antioxidantes enzimáticos	13
I.1.3. Generalidades de las PONs	13
I.1.4. Granada	15
I.1.5. Descripción taxonómica y botánica	15
I.1.6. Distribución	17
I.1.7. Composición de la granada	19
I.1.8. Usos de la granada en la industria	22
II. ANTECEDENTES	23
II.1.1. Empleo de la granada en la salud	23
II.1.2. Ateroeclerosis como problema	23
II.1.3. Estudios sobre la PON-1	24
II.1.4. Paraoxonasa 1 y aterosclerosis	24
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVO GENERAL	27
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	27

VII. MATERIALES Y MÉTODOS	28
VII.1.1. Animales y dietas	28
VII.1.2. Obtención de granada	28
VII.1.3. Sacrificio y medición de las variables	28
VII.1.4. Medición de la actividad de la PON-1	29
VIII. RESULTADOS	31
VIII.1.1. Actividad enzimática de la paraoxonasa 1 (PON-1)	31
VIII.1.2. Determinación de colesterol total	32
VIII.1.3. Fracción de colesterol HDL	33
VIII.1.4. Fracción de colesterol LDL	34
VIII.1.5. Triglicéridos	35
VIII.1.6. Peso corporal	36
IX. DISCUSIÓN	37
X. CONCLUSIONES	41
XI. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de iniciación, inflamación y aumento del estrés oxidativo en el progreso de la aterosclerosis	10
Figura 2. Estructura molecular de la paraoxonasa 1 (PON-1)	15
Figura 3. Granada (<i>Punica granatum</i> L.)	17
Figura 4. Principales componentes fenólicos presentes en la granada y sus efectos benéficos en la salud	21
Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología empleada para el estudio experimental	30
Figura 6. Actividad de la PON-1 en suero sanguíneo de ratones CD-1	31
Figura 7. Colesterol total en suero sanguíneo de ratones CD-1	32
Figura 8. Fracción de colesterol HDL en suero sanguíneo de ratones CD-1	33
Figura 9. Fracción de colesterol LDL en suero sanguíneo de ratones CD-1	34
Figura 10. Niveles de triglicéridos en suero sanguíneo de ratones CD-1	35
Figura 11. Diferencias en el peso corporal de ratones CD-1	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la granada	16
Tabla 2. Producción anual en toneladas (Ton) a nivel Nacional de granada, en los años 2007 a 2012	18
Tabla 3. Producción estatal en toneladas (ton) en Hidalgo, en los años 2007 a 2012	18
Tabla 4. Información nutrimental de 100 g de granada	20

RESUMEN

Se sabe que la paraoxonasa 1 (PON-1) está anclada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y es así como viaja en el torrente sanguíneo, *in vivo* ha demostrado tener propiedades antioxidantes; sin embargo, esta capacidad disminuye en condiciones aterogénicas. En este proceso ocurre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las HDL, por lo que la actividad de la PON-1 disminuye. Por otra parte, se ha observado que los compuestos fenólicos de algunos frutos poseen un papel protector frente al daño oxidativo implicado en el desarrollo de la aterosclerosis, que es una de las primeras causas de muerte en México. En este estudio se evaluó el jugo de granada fresco, por su alta capacidad antioxidante. Para ello, se alimentaron ratones CD-1 con una dieta probada por ser aterogénica, a otro grupo se suplementó con jugo de granada diariamente. Se midieron: actividad enzimática de la PON-1, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL y peso corporal. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en la actividad de la PON-1 ($p = 0,0004$), y HDL ($p = 0,0129$) en el grupo tratado + granada; además, se encontró una disminución significativa de colesterol total ($p = 0,0018$), LDL ($p = 0,0017$) y peso corporal ($p = 0,0365$); de tal manera que al final del estudio al hacer la comparación entre los grupos, no existió diferencia significativa entre ellos ($p > 0,05$), lo que sugiere que la suplementación diaria de jugo llevó a niveles normales los indicadores bioquímicos. Con esto se demuestra que el jugo de granada tiene propiedad anti-aterogénica, por lo que su consumo de manera cotidiana podría contribuir benéficamente ante los efectos ocasionados por la aterosclerosis.

Palabras clave: jugo de granada., paraoxonasa 1, HDL, colesterol total, aterosclerosis.

I. INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad crónica y progresiva, que se caracteriza por la formación de ateromas en los vasos sanguíneos y que es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo (Joven *et al.*, 2006). Las consecuencias de esta enfermedad han ocasionado en México un alto índice de mortalidad y morbilidad, en accidentes cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares (Navarro, 1999). La aterosclerosis se desarrolla durante años y tiene un origen multifactorial en el que están implicados factores genéticos y ambientales (Canales y Sánchez, 2003). La alteración patológica sobre las arterias grandes e intermedias, se caracteriza por el depósito abundante de lípidos y tejido fibroso en la pared arterial, produciendo la llamada placa ateromatosa sobre las superficies internas de las paredes vasculares (Rodríguez *et al.*, 2006) (Figura 1).

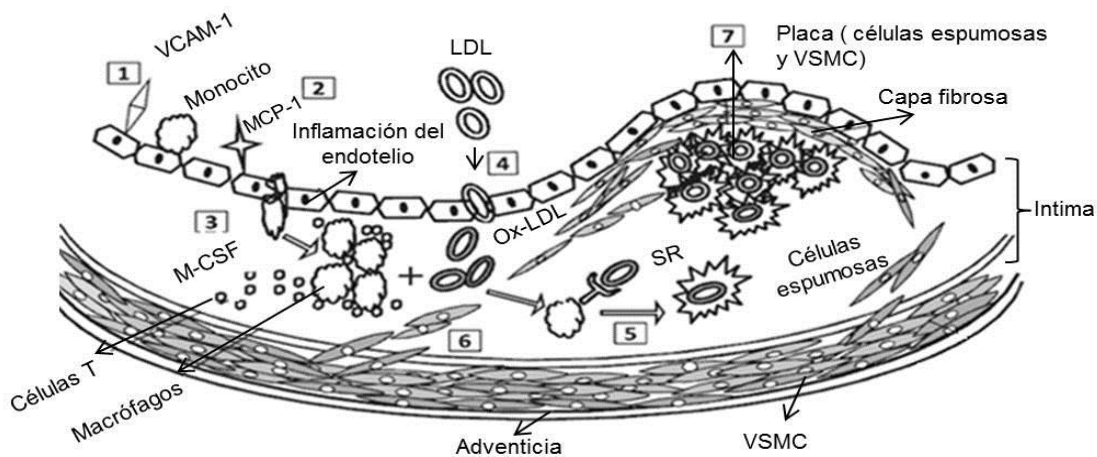


Figura 1. Proceso de iniciación, inflamación y aumento del estrés oxidativo en el progreso de la aterosclerosis. (1) VCAM-1 promueve la adhesión de monocitos. (2) MCP-1 promueven la migración de monocitos dentro de la íntima. (3) M-CSF estimula la transformación de monocitos a macrófagos (4) Depósito de LDL dentro de la íntima y oxidación (LDL-ox). (5) Los macrófagos se cargan de las LDL-ox junto con su receptor SR y se forman células espumosas. (6) Células T promueven la proliferación y migración de células musculares lisas desde la media a la íntima, donde cambian su fenotipo de elástico a secretor. (7) Formación de placa que incluye formación de capa fibrosa, células espumosas, células musculares lisas e inflamación que agravan el proceso.

Abreviaturas: (VCAM-1) Molécula de adhesión de células vasculares; (MCP-1) Proteína quimioattractora de monocitos; (M-CSF) Factor estimulante de colonia de macrófagos; (VSMC) células de músculo liso vascular; (LDL) lipoproteínas de baja densidad; (LDL-ox) lipoproteínas de baja densidad oxidadas; (SR) receptor scavenger. Tomado de Basu y Penugonda (2009).

La placa ateromatosa se genera principalmente por la alta concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes en suero sanguíneo, éstas LDL pueden infiltrarse y depositarse en el espacio subendotelial, la cual es una zona con poca actividad antioxidante, las células de la pared arterial secretan por su propio metabolismo, diversas sustancias oxidantes que rápidamente provocan la oxidación de los lípidos atrapados en el espacio subendotelial (Canales y Sánchez, 2003). Las LDL oxidadas (LDL-ox) provocan que las células endoteliales secreten sustancias quimioattractoras y promuevan la adhesión de monocitos y su posterior transformación a macrófagos; los macrófagos a su vez, se cargan de fagocitar el material lipídico oxidado en grandes cantidades, transformándose en células espumosas, al mismo tiempo ocurre la movilización de células de músculo liso originando la formación de la placa ateromatosa, ocasionando el endurecimiento y estrechamiento cada vez más de la arteria que agrava el proceso (Basu y Penugonda, 2009).

La placa puede ser estable, con crecimiento lento, desorganizando la arquitectura reduciendo el flujo sanguíneo; por otra parte, la placa inestable es más dañina debido a que puede romperse y al exponer su contenido, provoca la formación de coágulos, resultando la formación de trombos que bloquean en forma brusca el flujo sanguíneo, su efecto inmediato es un infarto cardíaco o un derrame cerebral (Fernández, 1999).

Existen factores de riesgo que promueve el desarrollo de la enfermedad como: hipertensión arterial, alta concentración de LDL, tabaquismo, malos hábitos alimentarios y falta de actividad física (Navarro, 1999). Sin embargo, si se detecta a tiempo, se puede retrasar o detener el progreso, lo cual para su tratamiento se

emplean drogas hipolipemiantes para disminuir la concentración de LDL, ya que niveles elevados de LDL suele ser un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Beltowski *et al.*, 2003). Sin embargo, existen alternativas naturales para disminuir el uso de fármacos, tal es el caso del jugo de granada, el cual ha demostrado tener propiedades anti-aterogénicas (Aviram *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2001; Rosenblat *et al.*, 2006).

Por su parte, la granada roja es un fruto que ha mostrado tener tres veces mayor capacidad antioxidante que otros frutos como: la naranja, la uva, e incluso que el arándano (Jurenka, 2008); asimismo, presenta mayor capacidad antioxidante que el vino tinto y el té verde (Gil *et al.*, 2000). El fruto, ha mostrado tener diversas propiedades medicinales y nutricionales debido a que posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico, destacando: compuestos polifenólicos como flavonoides, (principalmente antocianinos), favonoles (luteolina y quercitina) y taninos hidrolizables (elagitaninos y punicalaginos) así como vitaminas y minerales (Jurenka, 2008; Coop 2011). Aparentemente, estos compuestos son los principales en conferir los diversos beneficios a la salud (Barberán, 2010).

Debido a sus propiedades antioxidantes, el consumo de granada podría tener un efecto benéfico en disminuir y neutralizar el incremento del estrés oxidativo que ocurre en el organismo (Aviram *et al.*, 2000). Como se sabe, los antioxidantes, son sustancias químicas con capacidad de minimizar el proceso oxidativo y mantiene el equilibrio pro-oxidante/antioxidante del organismo. Éstos antioxidantes pueden ser no enzimáticos y enzimáticos (Montes, 2004).

I.1.1. Antioxidantes no enzimáticos

En este grupo están los endógenos (glutación reducido, albúmina, bilirrubina) y exógenos (vitaminas C, E y algunos minerales como magnesio, zinc, selenio) que funcionan como cofactores de las enzimas antioxidantes (Montes, 2004).

I.1.2. Antioxidantes enzimáticos

En este grupo se encuentran diversas enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, las glutación peroxidasas y la paraoxonasa 1 (PON-1); ésta última, es poco explorada como las anteriores pero existe gran interés en ella, ya que se ha demostrado que previene de la oxidación de las LDL y las HDL (Montes, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006).

I.1.3. Generalidades de las PONs

Las paraoxonasas son una familia de enzimas compuestas por tres miembros: PON-1, PON-2 y PON-3. El miembro más estudiado es la paraoxonasa 1 (PON-1). La enzima PON-1 [EC 3.1.8.1 arildialquilfosfatasa], es una esterasa dependiente de calcio (Figura 2), asociada a las HDL y que es codificada por el gen *PON-1* (Ferretti *et al.*, 2004).

En humanos, la PON-1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 entre la posición q21.3-q22.1 y es una proteína compuesta de 354 aminoácidos con un peso molecular de 43-45 kilodaltones (kDa) (Cataño, 2005). En mamíferos, la PON-1 se sintetiza en el hígado y se localiza sobre la superficie de las HDL, que es como viaja en el suero sanguíneo, por lo que se piensa que la enzima es anti-aterogénica (Rodríguez *et al.*, 2006).

La PON-1 es capaz de hidrolizar cierto número de sustratos especialmente a compuestos organofosforados, como el paraoxón (de ahí su nombre); como dato interesante, peces, artrópodos y aves, no tienen esta enzima por lo que estos organismos son más sensibles a este tipo de compuestos (Cataño, 2005). Sin embargo, hasta ahora se desconoce su papel fisiológico de la PON-1 (Guxens *et al.*, 2008).

Se sabe que en humanos, la PON-1 es una proteína polimórfica, con varios polimorfismos, tanto en la región promotora como en la región codificante. Los polimorfismos más estudiados son dos de la región codificante (PON-1₁₉₂ y PON-1₅₅); en PON-1₁₉₂ existe una sustitución del aminoácido glutamina (Q) por arginina (R), éste polimorfismo, causa una diferente actividad hidrolítica hacia diferentes sustratos (paraoxón, diazoxón, clorpirifos oxón, etc); por ejemplo, el alelo R hidroliza más eficientemente paraoxón que el alelo Q, aunque se ha visto que el polimorfismo no influye en la capacidad antioxidante de la PON-1 en prevenir de la oxidación de LDL y de las propias HDL (Guxens *et al.*, 2008) En el polimorfismo PON-1₅₅ existe una sustitución del aminoácido leucina por metionina (L/M); este polimorfismo aun no esta claro si es determinante de diferentes concentraciones séricas de la proteína PON-1 y es actualmente el más investigado (Nidhi *et al.*, 2009).

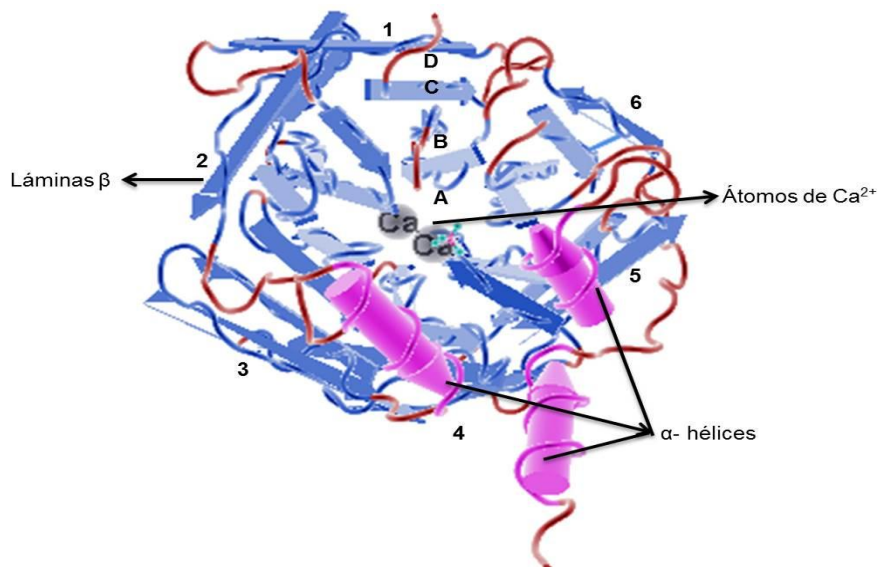


Figura 2. Estructura molecular de la paraoxonasa 1 (PON-1). Se muestra la localización intramolecular de la interacción con el calcio (un átomo de calcio es encargado de estabilizar la estructura y el otro se encarga de la actividad catalítica), presenta seis láminas β plegadas (numeradas del 1 al 6), cada lámina formada a su vez por cuatro filamentos β (nombradas de la A a la D) y tres α hélices que participan en el anclaje a las partículas HDL. Tomado de Harel et al. (2004).

I.1.4. Granada

El nombre científico de la granada, es *Punica granatum* L., “Punica” le fue atribuido por los romanos, ya que este arbusto fue introducido en las zonas mediterráneas por los cartagineses durante las Guerras Púnicas y “granatum” que significa manzana granulada y se refiere a la abundancia de las semillas del fruto (Teixeira *et al.*, 2013). La granada es un fruto muy antiguo, valorado por diversas culturas. El científico ruso Vavilov sitúa su origen en el centro de oriente próximo, que incluye el interior de Asia Menor, Transcaucasia, Irán y las tierras altas de Turkmenistán, extendiéndose por todo el mediterráneo, India y China. Se introdujo a México en el siglo XVI, por los misioneros españoles (Benavides *et al.*, 2010).

I.1.5. Descripción taxonómica y botánica

La familia Punicaceae está compuesta por un género y dos especies (*Punica protopunica* L. y *Punica granatum* L.) (Tabla 1), siendo la más importante *Punica granatum* L. que se cultiva por sus frutos, que son comestibles (Teixeira *et al.*, 2013).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la granada. Tomado de Andreu et al. (2008).

División	Fanerógamas
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Arquiclamídeas
Orden	Myrtales
Familia	Punicaceae
Género	<i>Punica</i>
Especie	<i>P. protopunica</i> L. <i>P. granatum</i> L.

Desde el punto de vista botánico, la granada es el fruto del granado, pequeño árbol caducifolio, con porte arbustivo (corona densamente ramificada) que puede alcanzar de 1 a 5 metros de altura. El tronco es delgado, torcido, liso. Las flores son hermafroditas, de color rojo naranja, muy atractivas, solitarias o en pequeños grupos al final de las ramas. El fruto es una baya grande, globosa, coronada por el cáliz, carnoso y persistente, de corteza gruesa coriácea, color rojo brillante o verde amarillento, formado por varias cavidades polispermas, separadas por membranas carpelares (pericarpio) lleno de semillas (arilos). El fruto es indehiscente de tipo balaústa (Teixeira *et al.*, 2013; Coop, 2011) (Figura 3).

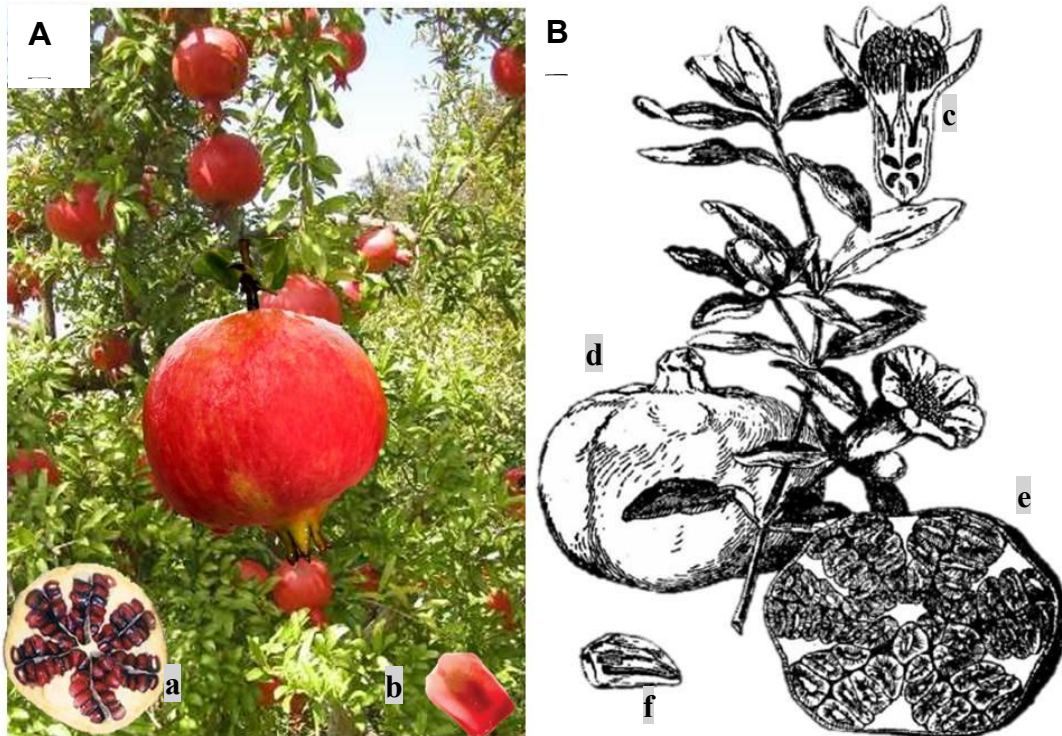


Figura 3. Granada (*Punica granatum* L.). A: maduración de granadas en el árbol. Corte longitudinal de la fruta mostrando las semillas (a). Parte comestible (arilo) (b); B: Rama en floración. Corte longitudinal de la flor (c). Fruta (d). Corte longitudinal de la fruta mostrando las semillas (e). Arilo (f). Tomado de Coop (2011).

I.1.6. Distribución

La granada se cultiva especialmente en regiones tropicales y subtropicales, en climas templados cálidos; puede crecer en cualquier tipo de suelo, aunque los óptimos para su desarrollo deben ser ligeros, permeables, profundos y secos. El árbol suele tolerar la sequía, el exceso de humedad, la salinidad, la clorosis férrica y caliza activa (Benavides *et al.*, 2010). Dentro de los principales países productores del fruto se encuentran: Afganistán, China, España, E.U.A, India, Irak, Irán, Israel, Pakistán, Siria, Túnez y Turquía; siendo Irán el principal productor con más de 650,000 toneladas por año e Israel con la más baja producción a nivel mundial con 20,000 toneladas por año, según datos registrados en el año 2009 (Barberán, 2010).

En México se cultiva en 16 estados (Tabla 2), siendo los estados con mayor producción anual: Oaxaca, Hidalgo y Guanajuato. En lo que respecta al estado de Hidalgo, los municipios con mayor producción son Tasquillo y Chilcuautla (Tabla 3) (SAGARPA, 2013).

Tabla 2. Producción anual en toneladas (Ton) a nivel nacional de granada, en los años 2007 a 2012.

Estado	2007 (Ton)	2008 (Ton)	2009 (Ton)	2010 (Ton)	2011 (Ton)	2012 (Ton)
Aguascalientes	36.00	18.00	20.00	24.00	8.00	0
Baja California	25.20	24.15	91.00	21.00	22.40	36.00
Coahuila	110.40	104.00	102.40	125.00	110.00	70.00
Colima	42.50	45.00	132.00	140.75	130.10	114.00
Guanajuato	1,314.00	796.00	805.00	676.00	524.00	1,076.50
Hidalgo	831.00	1,030.00	1,087.00	1,092.50	983.00	911.80
Jalisco	45.50	65.30	69.15	63.00	57.84	55.50
México	250.60	166.80	190.32	164.00	231.50	37.50
Michoacán	160.00	160.00	150.00	40.80	48.00	40.00
Morelos	0	150.00	200.00	0.00	0.00	90.00
Oaxaca	1,150.62	934.35	1,404.45	1,200.67	1,362.88	1,224.04
Puebla	0	0	140.00	40.50	138.00	134.80
Querétaro	12.50	12.00	9.00	12.00	10.75	11.00
San Luis Potosí	45.00	54.00	54.00	55.08	54.00	46.35
Sonora	108.00	170.00	218.00	704.00	360.00	586.92
Zacatecas	12.00	10.50	12.00	12.07	11.40	10.50
Total	4,143.32	3,740.10	4,684.32	4,371.37	4,051.87	4,444.91

Tabla 3. Producción estatal en toneladas (ton) en Hidalgo, en los años 2007 a 2012.

Municipio	2007 (Ton)	2008 (Ton)	2009 (Ton)	2010 (Ton)	2011 (Ton)	2012 (Ton)
Chilcuautla	0.00	208.00	260.00	280.00	240.00	200.00
Metzquitlán	72.00	60.00	60.00	60.00	66.00	66.60
Metztitlán	75.00	75.00	75.00	67.50	75.00	60.00
Tasquillo	630.00	630.00	630.00	625.00	546.00	529.20
Tecoautla	34.00	37.00	38.00	35.00	32.00	36.00
Zimapán	20.00	20.00	24.00	25.00	24.00	20.00
Total	831.00	1,030.00	1,087.00	1,092.50	983.00	911.80

I.1.7. Composición de la granada

El jugo de granada contiene numerosos compuestos químicos los cuales ejercen un efecto benéfico a la salud, especialmente debido a su capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante se debe principalmente a los compuestos fenólicos como flavonoides (antocianinos), los cuales también proporcionan color a la fruta (Lansky y Newman, 2007); además, presenta un alto contenido en punicalaginos, un potente componente antioxidante (Gil *et al.*, 2000). El jugo además contiene vitaminas y minerales como potasio, calcio, fósforo y magnesio, en general es bajo en carbohidratos (principalmente fructosa y glucosa), ácidos orgánicos, grasas y proteínas (Tabla 4) (Andreu *et al.*, 2008).

Diversos compuestos presentes en la granada tienen propiedades benéficas a la salud, como es el caso del ácido gálico y elágico (Aviram *et al.*, 2008); así como otros flavonoides del jugo como son los antocianinos (Miguel *et al.*, 2010). Además, en las diferentes partes de la granada (corteza del fruto, membranas carpelares, semillas, flores, hojas y raíz) se encuentran numerosos compuestos fenólicos que tienen un efecto benéfico en la salud (Figura 4) (Aviram *et al.*, 2008; Al-Muammar y Khan, 2012).

Tabla 4. Información nutrimental de 100 g de granada. Tomado de Coop (2011).

Nutriente	Unidad	Valor por 100g
Agua	g	77,93
Contenido energético	Kcal	75.5
Proteína	g	1.67
Grasas (Lípidos)	g	1,17
Carbohidratos	g	17.93
Fibra dietética	g	2,3
Azúcares totales	g	14.98
Sodio	mg	3.0
Vitamina C	mg	10.20
Vitamina E	mg	0,60
Vitamina B3	mg	0.29
Colesterol	mg	0.00
Fósforo	mg	13.67
Hierro	mg	0.30
Calcio	mg	10.00
Potasio	mg	236.00
Zinc	µg	0.35
Selenio	µg	0.50

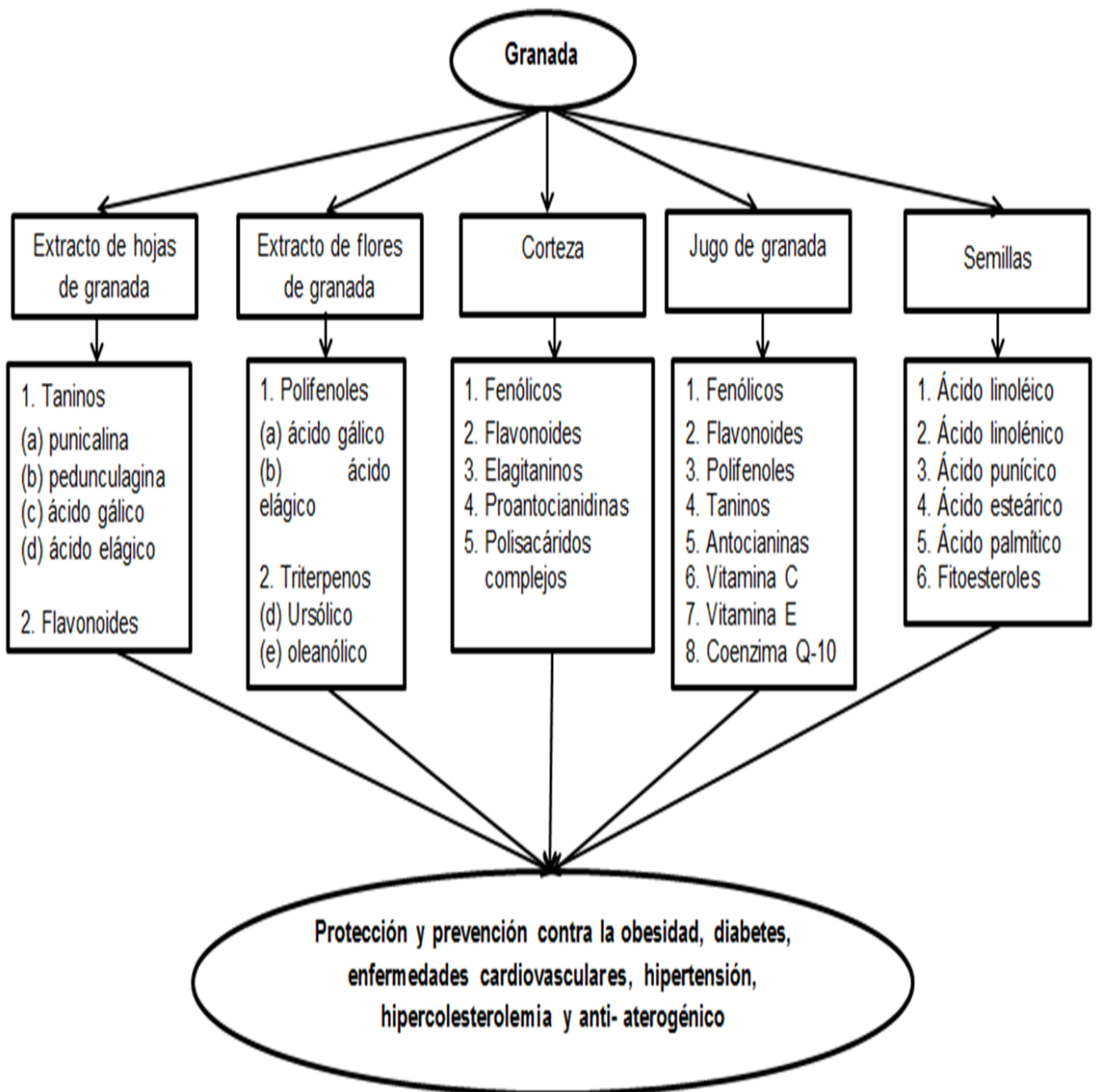


Figura 4. Principales componentes fenólicos presentes en la granada y sus efectos benéficos en la salud. Tomado de Al-Muammar y Khan (2012).

I.1.8. Usos de la granada en la industria

La pulpa de granada madura, es una buena fuente de jugo que sirve como base para la elaboración de bebidas, jarabes y otros productos similares (Viladomiu *et al.*, 2013). El pericarpio se emplea para teñir y en el arte de curtido (Andreu *et al.*, 2008). La corteza de las raíces contiene un alcaloide llamado pieleterina que se emplea por sus propiedades vermífugas (Benavides *et al.*, 2010). En la cocina, los arilos se usan como condimento y la planta se utiliza con fines ornamentales, por la belleza de sus flores (Jurenka, 2008).

II. ANTECEDENTES

II.1.1. Empleo de la granada en la salud

Desde la antigüedad se han conocido las propiedades medicinales de la granada, Plinio el Viejo (23-79 DC.) escribió sobre ella y sus propiedades medicinales en su *Historia Naturalis*. En la medicina Ayurvédica (medicina hindú), la granada era considerada en si misma, una buena alternativa como antiparasitario, antidiarreico y para la curación de úlceras de la boca (Basu y Penugonda, 2009). Sin embargo, en la red de internet sólo se puede ubicar entre 1950 y 1999, 25 publicaciones científicas sobre el uso de la granada en la medicina. (Jurenka, 2008). La base de datos de PubMed, a partir del año 2000 hasta la actualidad, revela que se han publicado más de 677 nuevos trabajos científicos relacionados con la granada y muchos de ellos sobre sus efectos en la salud (Viladomiu *et al.*, 2013).

Debido a sus componentes con alto valor biológico y a sus propiedades funcionales, el fruto se considera un alimento funcional (Barberán, 2010). Dentro de dichas propiedades se encuentran: anti-cancerígeno (Malik y Mukhtar, 2006; Lansky y Newman, 2007); anti-microbiano (Neurath *et al.*, 2004; Al-Zoreky, 2009) antioxidante (Gil *et al.*, 2000; Chidambara *et al.*, 2002; Rosenblat *et al.*, 2006; Mertens *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2008, Jurenka, 2008; Miguel *et al.*, 2010), anti-inflamatorio (Schubert *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2005) anti-aterogénico (Aviram *et al.*, 2000, 2004; Fuhrman *et al.*, 2005; Rosenblat *et al.*, 2006).

II.1.2. Aterosclerosis como problema

La aterosclerosis es una enfermedad que se caracteriza por el depósito y acúmulo de colesterol oxidado en la pared de los vasos sanguíneos lo que ocasiona un deterioro progresivo y una reducción del flujo sanguíneo. Esto ocasiona síntomas como dolor torácico, dificultad para respirar o dolor en las

extremidades e inicialmente los síntomas no se manifiestan hasta que se produce una complicación (Navarro, 1999; Joven *et al.*, 2006). Desde hace varias décadas se comenzó a responsabilizar al aumento de los lípidos y especialmente al colesterol, como uno de los factores que favorece el aumento del estrés oxidativo, el cual a su vez conduce a un mayor daño y alteración de la homeostasis intracelular, favoreciendo el desarrollo de procesos patológicos incluyendo el daño endotelial y la aterosclerosis (Fernández, 1999).

II.1.3. Estudios sobre la PON-1

En 1946, Abraham Mazur fue el primero en reportar la presencia de una enzima en el tejido animal que era capaz de hidrolizar compuestos organofosforados. Esto llevó a la identificación inicial de la enzima paraoxonasa sérica humana PON-1 en la década de 1950 (Van Himbergen *et al.*, 2006).

La PON-1 (EC 3.1.8.1) se identificó inicialmente en el campo de la toxicología puesto que era capaz de hidrolizar organofosforados sintéticos como pesticidas (paraoxón, metabolitos oxones de clorpirifós y de diazinón) o gases nerviosos (sarín y somán) (Cataño, 2005).

La enzima PON-1 es una proteína que se ha identificado en los mamíferos y que no se encuentra en peces e invertebrados (Canales y Sánchez, 2003). Existe una gran similitud en la organización estructural de los genes PON-1 de humanos y de ratones, de lo que se deduce su importancia metabólica en los mamíferos (Nidhi *et al.*, 2009).

II.1.4. Paraoxonasa 1 y aterosclerosis

Se ha demostrado que existe una relación inversa entre las HDL y el riesgo de desarrollar aterosclerosis (Valenzuela *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la PON-1

tiene un papel protector ante este proceso (Durrington *et al.*, 2001). Esto se basa en un estudio realizado en ratones *knock out PON-1*, a un grupo de estos ratones fueron alimentados con una dieta aterogénica, mientras que a otro grupo de animales normales, se le administró una dieta estándar y sirvieron como grupo control; el primer grupo fue más susceptible a desarrollar aterosclerosis en comparación del segundo. Esto demostró que la PON-1 puede jugar un papel en el desarrollo de aterosclerosis (Tward *et al.*, 2002). En otro estudio, *in vitro* se midió la actividad de la PON-1 en pacientes con enfermedad cardiovascular, se encontró que la actividad está disminuida significativamente en estos pacientes, comparado con sujetos sanos, esta actividad fue independiente de los polimorfismos de la proteína (Gamboa *et al.*, 2008). En otro estudio en el año 2008, se encontró que el alelo R del polimorfismo PON-1₁₉₂ (Q/R), es factor de riesgo de sufrir un infarto cardíaco (Guxens *et al.*, 2008), esto hace que algunos puedan ser más susceptibles a sufrir un accidente cardiovascular por la baja actividad enzimática de la PON-1. Sin embargo, la edad, los malos hábitos alimentarios, el tabaquismo y el alcoholismo afectan la actividad de la PON-1 (Fridman *et al.*, 2011). Se ha demostrado que en modelos animales la actividad puede ser incrementada de manera exógena, mediante la ingesta de alimentos con alto contenido en antioxidantes como es el caso del jugo de granada, que ha mostrado eficiencia en la neutralización de los radicales libres, ya que aumenta la capacidad antioxidante en plasma (Aviram *et al.*, 2000; Fuhrman *et al.*, 2005; Rosenblat *et al.*, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

Es de interés conocer cómo influye la actividad enzimática de la PON-1, en el proceso del desarrollo de la aterosclerosis, ya que esta enzima podría ser un blanco para prevenir o detener el desarrollo de la enfermedad.

En este estudio se considera la utilización del jugo de granada como una fuente natural con alto contenido en compuestos fenólicos; el cual podría inducir el incremento de la actividad de la PON-1.

Se ha demostrado que la PON-1 presenta propiedades anti-aterogénicas, si el consumo de jugo de granada tiene la capacidad de incrementar la actividad de la PON-1, se podría establecer un mecanismo de acción de la granada como anti-aterogénico por aumentar de manera exógena la actividad de la PON-1, por lo que podría inhibir o retardar el desarrollo de la aterosclerosis.

Su uso en la salud, podría disminuir los costos económicos y sociales que tienen las enfermedades cardiovasculares, al mejorar la calidad de vida o retrasar sus efectos, debido a que la aterosclerosis encabeza la lista de las principales causas de muerte y tienen un alto costo económico *per capita*. Asimismo, se podría estimular el consumo de la granada.

IV. HIPÓTESIS

La administración de una dieta aterogénica y la suplementación diaria con jugo fresco de granada en ratones CD-1, aumentan significativamente la actividad enzimática de la PON-1, los niveles de HDL en suero y disminuye de manera significativa, los niveles de colesterol total, LDL, triglicéridos y peso corporal.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación diaria de jugo fresco de granada sobre la actividad de la PON-1, los niveles de colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos y peso corporal en ratones CD-1 alimentados con una dieta aterogénica.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar cómo influye la suplementación diaria de jugo de granada durante cinco meses sobre la actividad enzimática de la PON-1 en suero sanguíneo de ratones CD-1 alimentados con una dieta aterogénica.
2. Determinar cómo influye la suplementación diaria de jugo de granada durante cinco meses sobre los niveles bioquímicos de colesterol total, HDL, LDL, y triglicéridos en ratones CD-1 alimentados con una dieta aterogénica.
3. Determinar cómo influye la suplementación diaria de jugo de granada durante cinco meses sobre la masa corporal en ratones CD-1 alimentados con una dieta aterogénica.
4. Evaluar el papel de la PON-1 como posible molécula blanco para el tratamiento de la aterosclerosis

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios experimentales con animales del presente proyecto, fueron llevados a cabo bajo guías de cuidado animal del Bioterio del IC Sa.

El diseño experimental del presente trabajo se muestra en la Figura 5.

VII.1.1. Animales y dietas

En este proyecto se emplearon 54 ratones macho de la cepa CD-1 del Bioterio del IC Sa, con un peso entre 20-25 g, se formaron aleatoriamente tres grupos: control, tratado y tratado + granada. Todos los grupos tuvieron acceso de agua *ad libitum*, el grupo control fue alimentado con una dieta comercial Harlan Tekla®, y otros dos grupos experimentales fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica según reportada por Shimada et al. (1996), la cual consiste en: 1.25% (peso/peso) de colesterol, 0.05% (peso/peso) de colato de sodio, 15% (peso/peso) de grasa saturada en forma de mantequilla de cacao. El grupo tratado + granada fue suplementado diariamente con 300 μ L de jugo de granada fresco (\sim 8 μ mol polifenoles totales) por vía intragástrica utilizando una cánula.

VII.1.2. Obtención de granada

Granada roja fue obtenida del municipio de Tasquillo Hidalgo, México. Las granadas se lavaron y para la obtención del jugo, se realizó un corte longitudinal del fruto y con ayuda de un exprimidor casero se exprimieron los arilos para obtener el jugo, el cual fue empleado de inmediato o en su caso se almacenó en congelación a -4 °C hasta su uso.

VII.1.3. Sacrificio y medición de las variables

Al inicio (tiempo cero) y en cada mes se sacrificaron tres animales por decapitación, previo a esto, el alimento fue retirado. Se colectó la mayor cantidad de sangre total en tubos Eppendorf, posteriormente se centrifugó la muestra a

2500 rpm para la obtención de suero sanguíneo, el cual fue empleado para medir con kit enzimáticos (Roche diagnostics, Mannheim, Alemania), los niveles de colesterol total, fracción de colesterol HDL y triglicéridos. La fracción de colesterol LDL se calculó con la fórmula de Friedewald et al. (1972).

VII.1.4. Medición de la actividad de la PON-1

La medición de la actividad PON-1 se realizó mediante un método semi-automatizado (Charlton *et al.*, 2006). Este método emplea un sistema de medición en microplaca de 96 pozos y un lector de micro-placas (Bio-Tek Junior). La programación de los parámetros fueron los siguientes: Modo cinético, filtro de 405 nm, tiempo log 0.42 m, intervalo de tiempo 1.25 m, tiempo total de medición 5 min. La temperatura de medición de la actividad fue entre 24.5-25.5 °C. Básicamente, el método consistió en adicionar 10 µL de muestra (suero sanguíneo) por duplicado en la columna de la microplaca, se agregaron 200 µL del sustrato de paraoxón (3.3 mM), mismo que se preparó en el momento de su uso, este método consistió en agregar paraoxón a un regulador conteniendo 2 mM de CaCl₂ y 100 mM de Tris pH= 8.0. Como muestra blanco, se agregaron 210 µL del sustrato de paraoxón en otra columna de pozos. Los valores de absorbancia a 405 nm fueron grabados y procesados (incluyendo el factor de corrección de paso de luz) por el mismo lector que nos dio valores expresados en nmol.min⁻¹.mL⁻¹. Para el análisis de los datos, se utilizó un paquete estadístico (GraphPad Prism 5.01. San Diego California, USA), se emplearon pruebas de *t* de Student para la comparación de medias y pruebas de ANOVA y post-hoc para la comparación de más de dos grupos. Los resultados fueron expresados como la desviación estándar de la distribución de la muestra media. Las diferencias fueron consideradas significantes si $p < 0.05$.

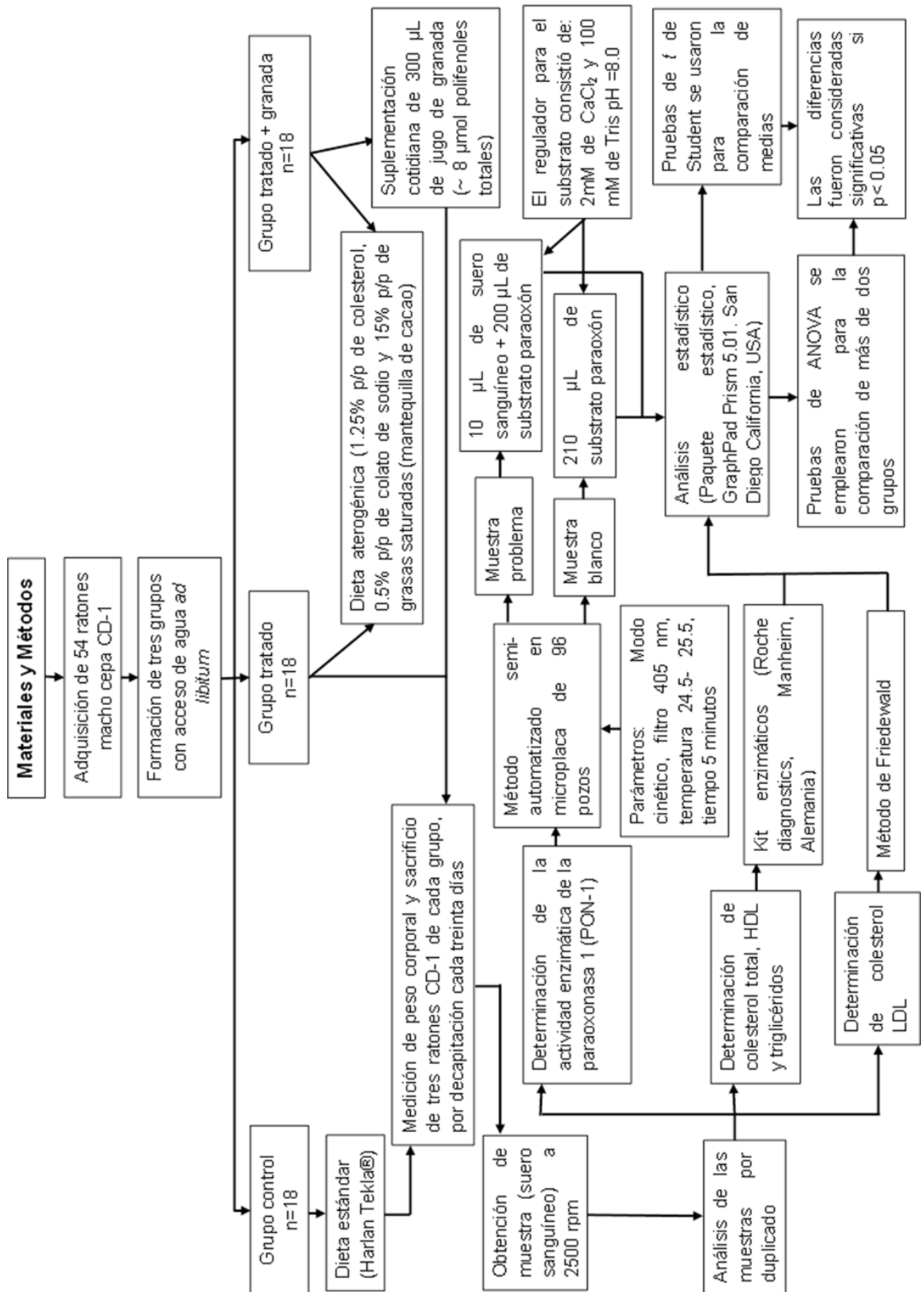


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología empleada para el estudio experimental.

VIII. RESULTADOS

VIII.1.1. Actividad enzimática de la paraoxonasa 1 (PON-1)

Los datos de actividad de la PON-1 entre los diferentes grupos tratados se muestran en la Figura 6. Después de la suplementación con jugo de granada de manera cotidiana en el grupo tratado + granada, se observa, un incremento en la actividad de la PON-1 a partir del segundo mes de experimentación comparado con el grupo tratado (sin suplementación con jugo); a partir del cuarto mes y quinto mes, éste incremento, fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$ y $p = 0,0004$, respectivamente); al final, los valores de actividad de la PON-1 son cercanos al grupo control; al realizar la comparación entre el grupo control y el grupo tratado + granada, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,2026$), lo que sugiere que la suplementación contrarresta el efecto de la dieta.

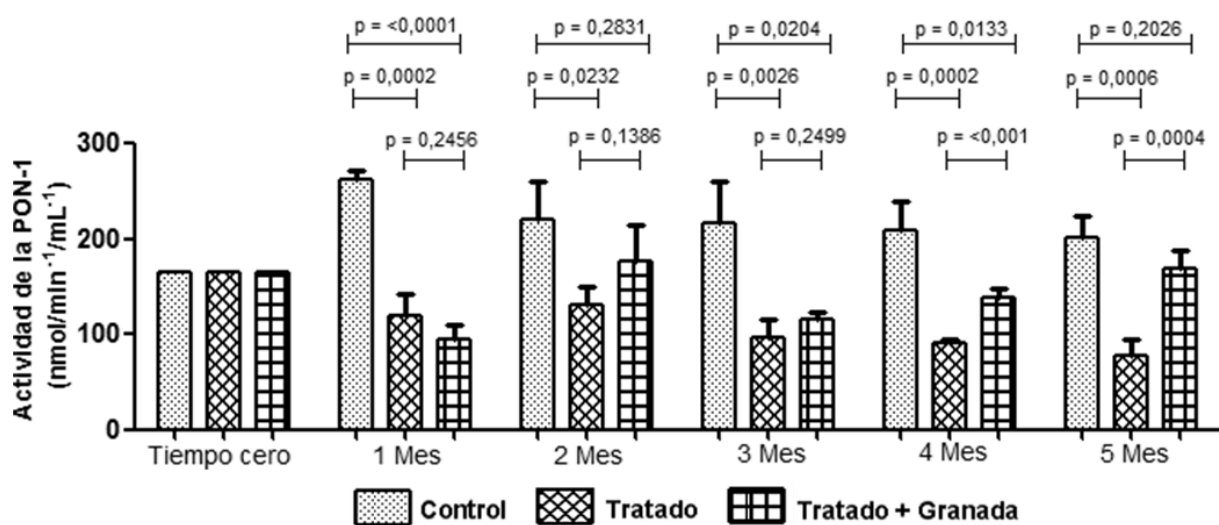


Figura 6. Actividad de la PON-1 en suero sanguíneo de ratones CD-1. El grupo control fue alimentado con una dieta estándar, y otros dos grupos experimentales (tratado y tratado + granada) fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica. El grupo tratado + granada fue suplementado cotidianamente con 300 μ L de jugo fresco de granada roja por cinco meses. Diferencias significativas se encontraron principalmente a partir del cuarto y quinto mes en el grupo suplementado en comparación con el grupo tratado (sin suplementación).

VIII.1.2. Determinación de colesterol total

Al inicio del estudio, los dos grupos alimentados con una dieta aterogénica, mostraron un incremento significativo en los niveles de colesterol total en comparación con el grupo control (Figura 7). A partir del segundo mes, el grupo tratado + granada, disminuyó los niveles de colesterol total en comparación con el grupo tratado; teniendo diferencias significativas en el cuarto y quinto mes ($p = 0,0013$ y $p = 0,0018$, respectivamente). Al comparar los valores de colesterol total del cuarto y quinto mes del grupo tratado + granada con el grupo control, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,2306$ y $p = 0,5493$, respectivamente), lo que sugiere que la suplementación con jugo, contribuyó a tener valores cercanos al grupo control, a pesar que el grupo tratado + granada recibió una dieta aterogénica (rica en colesterol). Por lo contrario, al comparar los valores del grupo tratado del cuarto y quinto mes, con el grupo control, se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol ($p = 0,0005$ y $p = 0,0193$, respectivamente), lo que comprueba que la dieta aterogénica incrementó los niveles de colesterol en los ratones.

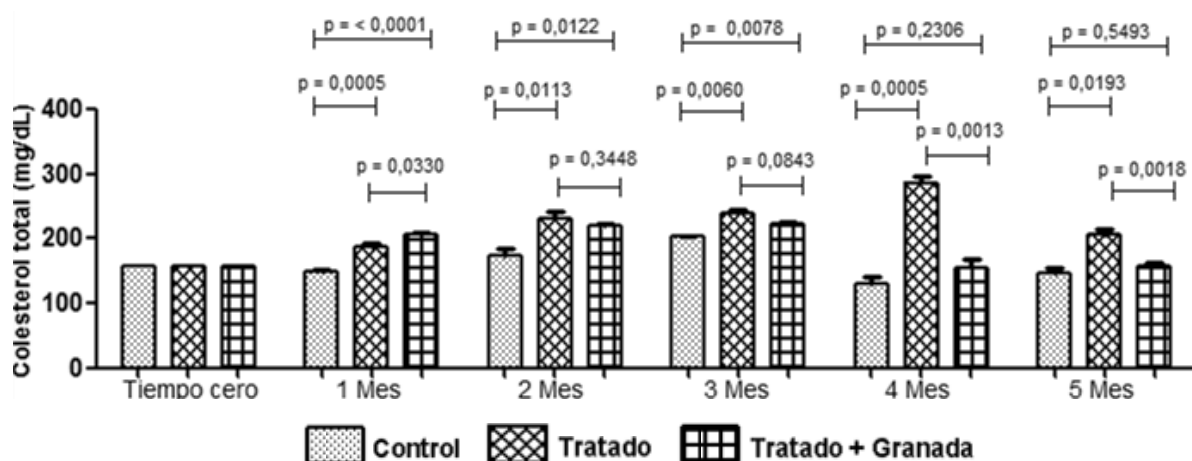


Figura 7. Colesterol total en suero sanguíneo de ratones CD-1. El grupo control fue alimentado con una dieta estándar, y otros dos grupos experimentales (tratado y tratado + granada) fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica. El grupo tratado + granada fue suplementado cotidianamente con 300 μ L de jugo fresco de granada roja por cinco meses. Diferencias significativas se encontraron a partir del cuarto y quinto mes en el grupo tratado + granada en comparación con el grupo tratado (sin suplementación).

VIII.1.3. Fracción de colesterol HDL

Para este caso, los niveles de la fracción de colesterol HDL del grupo tratado + granada (Figura 8), disminuyen significativamente comparado con el grupo control ($p = 0,0150$) e incluso comparado con el grupo tratado (sin suplementación) ($p = 0,0233$). No obstante, tras la suplementación diaria en el grupo tratado + granada, se observa, que a partir del tercer mes de tratamiento, los valores de HDL se incrementan significativamente comparado con el grupo tratado ($p = 0,0362$), teniendo en el quinto mes una diferencia altamente significativa ($p = 0,0129$); a pesar que ambos grupos se alimentaron con la misma dieta inductora de aterosclerosis. En el quinto mes de experimentación se observa una disminución significativa en los niveles de la fracción de colesterol HDL en el grupo tratado, comparado con el grupo control ($p = 0,0027$). Sin embargo, es interesante destacar que con la suplementación de jugo en el grupo tratado + granada, los valores de HDL están por encima del grupo control, sin embargo, el incremento no es estadísticamente significativo ($p = 0,6779$).

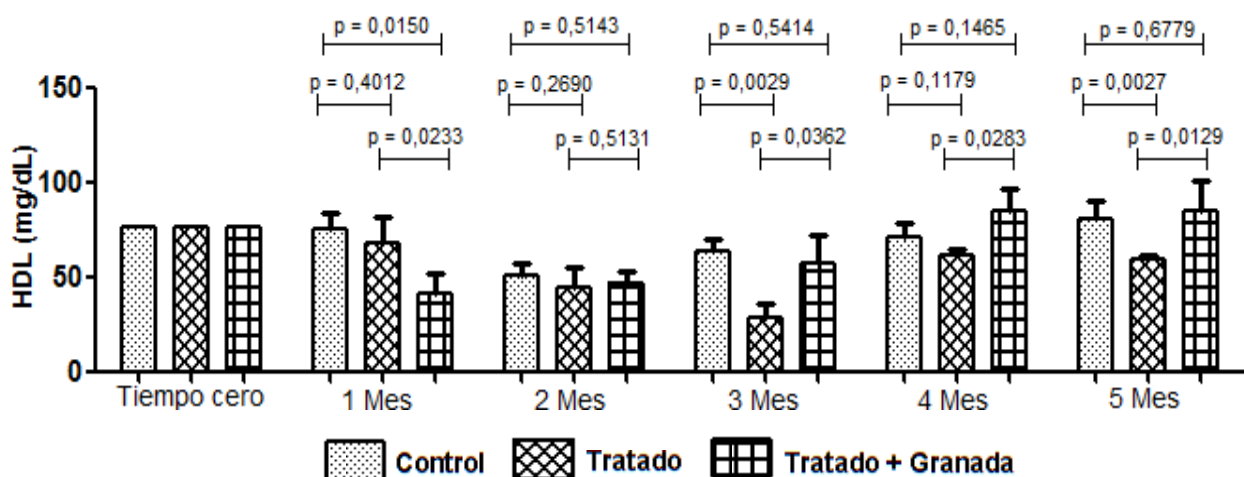


Figura 8. Fracción de colesterol HDL en suero sanguíneo de ratones CD-1. El grupo control fue alimentado con una dieta estándar, y otros dos grupos experimentales (tratado y tratado + granada) fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica. El grupo tratado + granada fue suplementado cotidianamente con 300 μ L de jugo fresco de granada roja por cinco meses. Diferencias significativas se encontraron a partir del cuarto y quinto mes en el grupo tratado + granada en comparación con el grupo tratado (sin suplementación).

VIII.1.4. Fracción de colesterol LDL

Los resultados de la fracción LDL se muestra en la Figura 9, como se puede observar, en el primer mes de experimento, se observa que el grupo tratado + granada tuvo un incremento significativo de niveles de LDL comparado con el grupo tratado ($p = 0,0019$); sin embargo, en los meses posteriores la concentración de LDL se fue invirtiendo de tal manera que al final del experimento, el grupo tratado + granada mostró estadísticamente los niveles de LDL más bajos, en comparación con el grupo tratado (sin suplementación) ($p = 0,0017$); a pesar de que ambos grupos recibían la misma dieta aterogénica. Al hacer la comparación entre el grupo tratado + granada con el grupo control, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,0917$), lo que sugiere que la suplementación influyó en la disminución de LDL, alcanzando valores similares del grupo control. Por lo contrario, al comparar el grupo tratado con el grupo control se encontraron diferencias significativas en los niveles de LDL ($p = 0,0002$), lo que comprueba que la dieta aterogénica incrementó los niveles de LDL en los ratones.

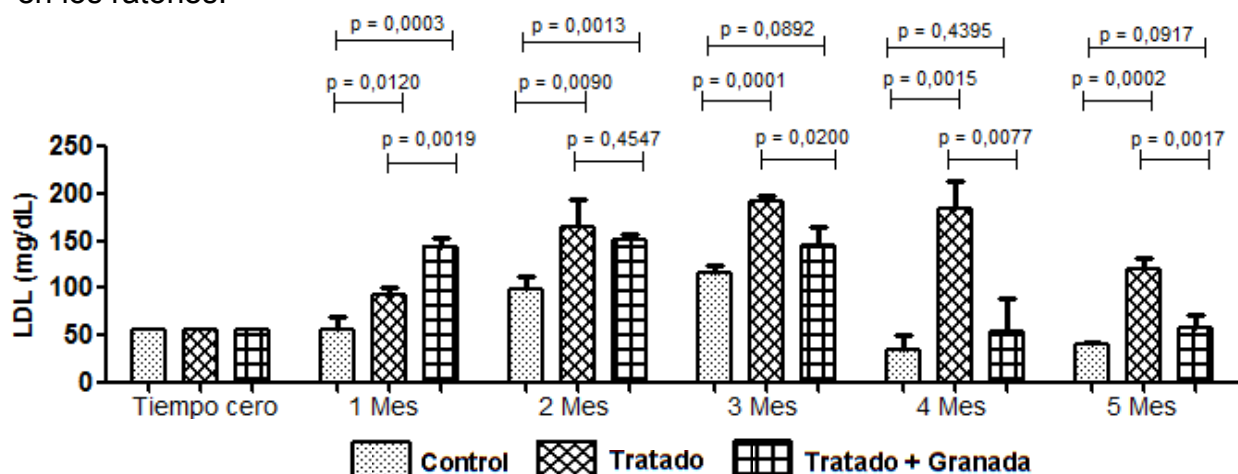


Figura 9. Niveles de colesterol LDL en suero de ratones CD-1. El grupo control fue alimentado con una dieta estándar, y otros dos grupos experimentales (tratado y tratado + granada) fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica. El grupo tratado + granada fue suplementado cotidianamente con 300 μ L de jugo fresco de granada roja por cinco meses. Diferencias significativas se encontraron a partir del cuarto y quinto mes en el grupo tratado + granada en comparación con el grupo tratado (sin suplementación).

VIII.1.5. Triglicéridos

Los datos de los niveles de triglicéridos se muestran en la Figura 10, como se puede observar, a partir de la alimentación con dieta aterogénica, los valores de triglicéridos disminuyen a lo largo de todo el experimento, lo que fue contrario a lo que se esperaba. De acuerdo con esto el jugo de granada no tuvo efecto significativo, sin embargo, se observa una disminución de triglicéridos en el grupo tratado + granada en comparación con el grupo tratado aunque ésta disminución no fue significativa ($p > 0,05$); por otra parte, los valores de triglicéridos del grupo control se mantuvieron constantes a lo largo del experimento, por lo que la dieta comercial tampoco influyó en el aumento del perfil lipídico en este grupo.

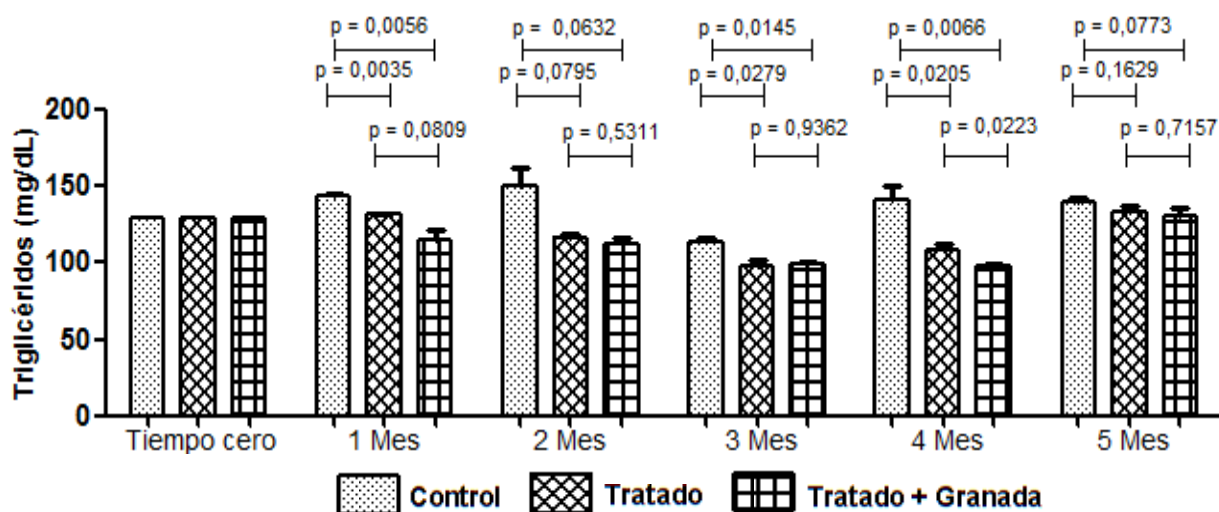


Figura 10. Niveles de triglicéridos en suero sanguíneo de ratones CD-1. El grupo control fue alimentado con una dieta estándar, y otros dos grupos experimentales (tratado y tratado + granada) fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica. El grupo tratado + granada fue suplementado cotidianamente con 300 μ L de jugo fresco de granada roja por cinco meses. No se encontraron diferencias significativas al final del estudio, aunque el grupo tratado + granada mostró los niveles más bajos en comparación con el grupo tratado (sin suplementación).

VIII.1.6. Peso corporal

Los resultados mostrados en la Figura 11, muestran que después de cinco meses de tratamiento con dieta aterogénica, se observó una ganancia de peso en el grupo tratado, comparado con el grupo control ($p = 0,0539$). Al final del estudio, se observó una diferencia significativa en la disminución de peso entre el grupo tratado + granada, comparado con el grupo tratado ($p = 0,0365$) e incluso comparado con el grupo control, sin embargo, ésta disminución de peso no es estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

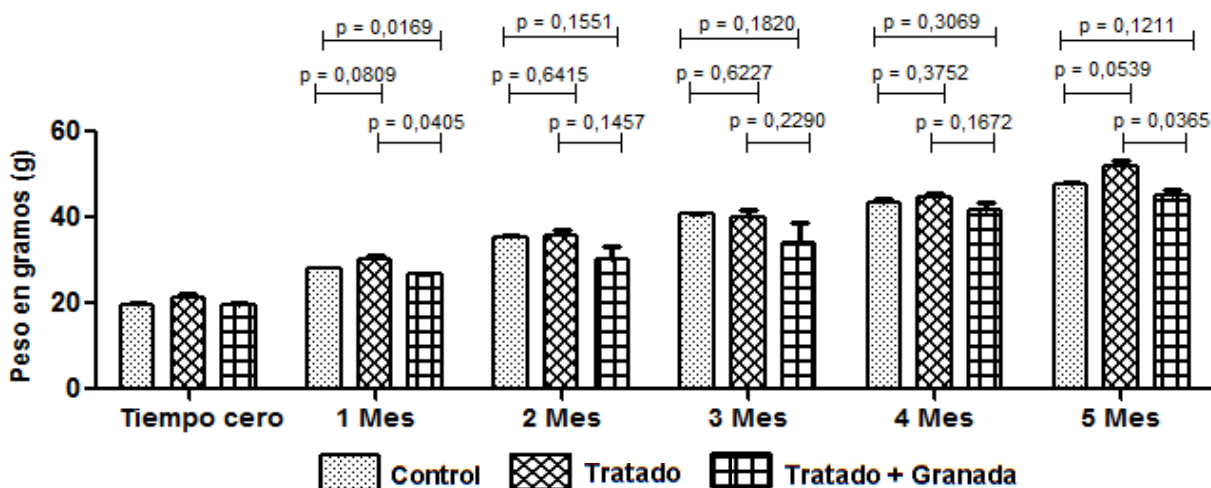


Figura 11. Diferencias en el peso corporal de ratones CD-1. El grupo control fue alimentado con una dieta estándar, y otros dos grupos experimentales (tratado y tratado + granada) fueron alimentados con dieta comprobada por ser aterogénica. El grupo tratado + granada fue suplementado cotidianamente con 300 μ L de jugo fresco de granada roja por cinco meses. Diferencias significativas en el peso corporal se encontró en el quinto mes en el grupo tratado + granada, en comparación con el grupo tratado (sin suplementación).

IX. DISCUSIÓN

El jugo de granada ha mostrado tener propiedad anti-aterogénica, tanto en modelos animales como en humanos (Aviram *et al.*, 2000, 2004; Boullier *et al.*, 2001; Sezer *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2009), y esto es debido probablemente a los compuestos fenólicos, los cuales tienen acción antioxidante que protege frente a los radicales libres retrasando el proceso de envejecimiento de las células, cuya actividad captadora de radicales libres ha sido demostrada en distintos estudios (Espín *et al.*, 2000 ; Gil *et al.*, 2000).

Por otra parte, la paraoxonasa 1 (PON-1) ha demostrado tener *in vivo* propiedades anti-aterogénicas debido a que previene de la oxidación de las LDL y HDL (Rodríguez *et al.*, 2006), por su capacidad de hidrolizar lípidos oxidados, fosfolípidos y ésteres de colesterol peroxidados ante un proceso aterosclerótico (Montes, 2004). Actualmente, la incidencia de la aterosclerosis en México es un problema de salud pública, en el cual se acompaña por una aceleración del estrés oxidativo (Navarro, 1999). Por ello, conocer los niveles de la PON-1 podría ser esencial, para establecer la susceptibilidad de sufrir un accidente cardiovascular (Guxens *et al.*, 2008).

En los resultados obtenidos se observa una disminución de peso corporal (Figura 11) en ratones CD-1 suplementados con jugo de granada, lo cual puede deberse a la composición del fruto, el cual contiene 80% de agua y alrededor de 15 % azúcares, como lo reporta Benavides *et al.* (2010), estas propiedades hacen que el jugo sea hipocalórico por su bajo índice glucémico y podría emplearse para el tratamiento de sobrepeso (García y Pérez, 2004; Al-Muammar y Khan 2012), ya que se ha investigado que la granada puede inhibir el desarrollo de la obesidad y

la hiperlipidemia a pesar de que exista un alto consumo en grasas, ya que al parecer inhibe la actividad de la lipasa pancreática e influye en la supresión de ingesta calórica, por lo tanto tendría aplicaciones en el tratamiento contra la obesidad (Lei *et al.*, 2007; Rosenblat y Aviram, 2011). Asimismo, en el grupo suplementado con jugo de granada se observó una disminución significativa de los parámetros bioquímicos como colesterol total (Figura 7) y triglicéridos (Figura 10); sin embargo, éste último no fue estadísticamente significativo, pero si se observa una disminución de triglicéridos en el grupo tratado + granada a diferencia del grupo tratado (sin suplementación), lo que concuerda con diversos estudios que demuestran que *in vivo* e *in vitro* la granada reduce el colesterol y mejora el perfil lipídico (Kaplan *et al.*, 2001; Medjakovic, 2013). Además, la granada podría ser útil en el tratamiento del síndrome metabólico que se caracteriza por la presencia simultánea de diferentes factores de riesgo cardiovascular en un mismo individuo, especialmente obesidad, diabetes tipo II, hipertensión e hiperlipidemia (Rashidi *et al.*, 2013). La disminución de estos indicadores puede ser debido a los componentes mayoritarios del jugo, que son los polifenoles, principalmente punicalaginos y antocianinos (Basu y penugonda, 2009; Coop, 2011, Al-Muammar y Khan, 2012) los cuales se han reportado en varios estudios (Aviram *et al.*, 2000, 2004) que contribuyen a disminuir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) por tener tres veces mayor actividad antioxidante que otros jugos (Rosenblat *et al.*, 2006). Asimismo, algunos componentes del jugo, como los taninos hidrolizables, contribuyen por su efecto anti-inflamatorio durante la creación del ateroma reduciendo la inflamación endotelial, como lo reportó Aviram *et al.* (2004).

La acción anti-inflamatoria de los taninos resulta de gran importancia para mediar y prevenir procesos patológicos del sistema cardiovascular, tales como accidentes cardiovasculares (consecuencia común de la aterosclerosis) (Fernández, 1999; García *et al.*, 2003), sin embargo, en este trabajo no se realizaron cortes histológicos de aorta para comprobar el depósito de estría grasa en las paredes arteriales de los ratones CD-1, sólo se midieron indicadores bioquímicos, debido a que se ha reportado que la dieta inducida favorece el desarrollo de la aterosclerosis, produciendo lesiones relativamente pequeñas (Joven *et al.*, 2006). Por lo tanto, al dar una dieta alta en grasas de manera cotidiana, se produce un desequilibrio metabólico acelerando el estrés oxidativo y promueve el desarrollo de la aterosclerosis como lo reporta Shimada *et al.* (1996). Esta alteración a su vez produce una disminución de la actividad de la PON-1 y HDL (Figuras 6 y 8). Sin embargo, tras la administración con jugo de granada de manera cotidiana, al final del estudio se observó que la actividad de la PON-1 y HDL aumentaron significativamente, lo que concuerda con trabajos previos (Aviram *et al.*, 2000; Betanzos *et al.*, 2011). La suplementación con jugo de granada también hizo posible la disminución de los niveles de colesterol LDL (Figura 9), a pesar de recibir una dieta alta en grasas de manera constante y esto es debido a que el jugo de granada inhibe las modificaciones aterogénicas de las LDL, incluyendo su retención, oxidación y agregación y esto puede estar relacionado por la habilidad del jugo en la atenuación de la activación plaquetaria, que es un importante factor de riesgo adicional para el desarrollo de la aterosclerosis (Aviram *et al.*, 2000). Según Kaplan *et al.* (2001), la disminución de los indicadores bioquímicos como colesterol total y la fracción de colesterol LDL y el aumento de la actividad de la PON-1 se debe a las propiedades

antioxidantes del fruto combinado con compuestos que retardan la absorción intestinal de grasas, lo que sugiere que la granada está influyendo benéficamente contrarrestando el proceso de aterosclerosis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que el consumo continuo de jugo de granada durante un periodo prolongado, es capaz de mantener los niveles de la actividad de la PON-1 cercanamente a valores similares al grupo control y con ello incrementar la defensa antioxidante *in vivo*, tal y como lo reportó Betanzos et al. (2011). Para el caso del humano, cabe hacer énfasis que es necesario tomar en cuenta que la enzima es polimórfica y otros factores como presencia de enfermedades crónicas, tipo de alimentación, ambiente social y factores externos, implica que algunos sean más susceptibles ante un proceso aterogénico, a pesar de que se ingiera un fruto que contenga ricos componentes de alto valor biológico (Jurenka, 2008), sería de interés conocer si existen polimorfismos genéticos en el genoma del animal estudiado (Guxens *et al.*, 2008).

Por otra parte, es necesario llevar a cabo más investigación con respecto a las propiedades de la granada y sus efectos en la salud (Viladomiu *et al.*, 2013) con el fin de impulsar su cultivo en el estado y destacar su competitividad a nivel nacional, debido a que el estado de Hidalgo por su ubicación geográfica, presenta las condiciones ideales para llevar a cabo el cultivo de granada, además, la granada se puede producir en condiciones en las que otros frutales más importantes no lo harían de manera rentable (Mondragón y Juárez, 2008), por lo tanto, la producción de granada podría ser un medio de ingreso económico adicional para los productores hidalguenses.

X. CONCLUSIONES

1. La suplementación diaria de 300 μ L de jugo fresco de granada ($\sim 8 \mu\text{mol}$ de polifenoles totales) incrementó de manera significativa la actividad de la PON-1 en el cuarto y quinto mes, en ratones CD-1 alimentados con dieta aterogénica.
2. La suplementación diaria de 300 μ L de jugo fresco de granada ($\sim 8 \mu\text{mol}$ de polifenoles totales) disminuyó los niveles de colesterol total y LDL, y aumentó los niveles de HDL de manera significativa en el cuarto y quinto mes en ratones CD-1 alimentados con dieta aterogénica y fueron estadísticamente significativos al compararse con el grupo no suplementado.
3. La suplementación diaria de 300 μ L de jugo fresco de granada ($\sim 8 \mu\text{mol}$ de polifenoles totales) no tuvo efecto significativo en los niveles de triglicéridos en ratones CD-1 alimentados con dieta aterogénica, sin embargo se observó una tendencia a disminuir.
4. El incremento de la enzima podría ser la posible molécula blanco para el tratamiento de la aterosclerosis, sin embargo, futuras investigaciones tendrán que dirigirse para confirmar esto, así como de los componentes presentes en la granada para conocer los mecanismos de acción y los principios activos de la granada que actualmente no están esclarecidos y conocer su efecto en la salud y con ello impulsar un mayor cultivo del fruto en Hidalgo.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, S., Wang, N. y Hafeez, B. 2005. *Punica granatum* L. extracts inhibits IL 1Beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes *in vitro*. *Journal of Nutrition*, 135, 2096-2102.
- Al-Zoreky, N.S. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 244-248.
- Al-Muammar, M.N. y Khan, F. 2012. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum* L.). *Nutrition*, 28, 595-604.
- Andreu, A., Signes, A. y Carbonell, A. 2008. La granada y su zumo, producción, composición y propiedades beneficiosas para la salud. *Alimentación equipos y tecnología*, 234, 36-40.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. y Fuhrman, B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E deficient mice 1, 2. *Clinical Nutrition*, 71, 1061-1076.
- Aviram, M., Rosenblat, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H. y Hayek, T. 2004. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*, 23, 423-433.
- Aviram, M., Volkova, N., Coleman, R., Dreher, M., Kesava, M., Ferreira, D. y Rosenblat, M. 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1148-1157.
- Barberán, F. 2010. Granada y salud: aspectos farmacológicos y terapéuticos de la granada. En: El Granado I Jornadas nacionales sobre el granado: producción, economía, industrialización, alimentación y salud. Melgarejo, P., Hernández, F. y Legua, P. (Eds). *Elche, España*. p. 205-212.
- Basu, A. y Penugonda, K. 2009. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*, 67, 49-56.
- Beltowski, J., Wojcicka, G. y Jamroz, A. 2003. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON-1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis*, 170, 21-29.
- Benavides, A., Hernández, R., Ramírez, H. y Sandoval, A. 2010. Tratado de botánica económica moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 332 p.

- Betanzos, G., Guerrero, J.A., Martínez, M.M., Calderón, Z., Belefant, H. y Cancino, J.C. 2011. Pomegranate juice increases levels of paraoxonase1 (PON-1) expression and enzymatic activity in streptozotocin-induced diabetic mice fed with a high-fat diet. *Food Research International*, 44, 1381-1385.
- Boullier, A., Hennuyer, N., Tailleux, A., Furman, C., Duverger, N. y Caillaud, J.M. 2000. Increased levels of high-density lipoprotein cholesterol are ineffective in inhibiting the development of immune responses to oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (apo) A-I with severe hypercholesterolaemia. *Clinical Science*, 100, 343-355.
- Canales, A. y Sánchez, F.J. 2003. Paraoxonasa, ¿algo más que una enzima? *Medicina Clínica*, 121, 537-548.
- Cataño, H., Cardenas, A., Cueva, J., Zavaleta, A., Izaguirre, V. y Carranza, E. 2005. Actividad y fenotipos de la paraoxonasa 1, en una población de estudiantes universitarios de Lima Perú. *Ciencia e Investigación*, 8, 40-47.
- Charlton-Menys, V., Liu, Y. y Durrington, P.N. 2006. Semiautomated method for determination of serum paraoxonase activity using paraoxon as substrate. *Clinical Chemistry*, 52, 453-457.
- Chidambara, K.N., Jayaprakasha, G.K. y Singh, R.P. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract using *in vivo* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4791-4795.
- Coop, O. 2011. Efecto protector del jugo de granada (*Punica granatum* L.) sobre complicaciones de la diabetes. Tesis de Maestría en Nutrición Humana. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Querétaro. 98 p.
- Davidson, M.H., Maki, K.C., Dicklin, M.R., Feinsein, S.B., Witchger, M.S., Bell, M., McGuire, D.K., Provos, J.C., Liker, H. y Aviram, M. 2009. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *American Journal of Cardiology*, 104, 936-942.
- Durrington, P.N., Mackness, B. y Macknes, M. 2001. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21, 473-480.
- Espín, J.C., Soler, C., Wichers, H.J. y García, C. 2000. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1588-1592.

- Ferretti, G., Bacchetti, D., Busni, R., Rabini, A. y Curatola, G. 2004. Protective effect of paraoxonase activity in high- density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 Diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 2957-2962.
- Fernández, J.E. 1999. Ateroesclerosis, colesterol y pared arterial: algunas reflexiones. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 18, 169-175.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I. y Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, 499-502.
- Fridman, O., Fuchs, A., Porcile, R., Morales, A y Gariglio, L.O. 2011. Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica. *Archivos de cardiología de México*, 81, 251-260.
- Fuhrman, B., Volkova, N. y Aviram, M. 2005. Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 570-576.
- Gamboa, R., Regalado, J., Huesca, C., Posadas, C., Verdejo, J., Vargas, G. y Pérez, O. 2008. Actividades paraoxonasa y arilesterasa bajas en sujetos mexicanos con enfermedad arterial coronaria. *Archivos de cardiología de México*, 78, 360-368.
- García, C. y Pérez, A. 2004. La granada. Alimento rico en polifenoles antioxidantes y bajo en calorías. *Alimentación Nutrición y Salud*, 11, 113-120.
- García, D., García, R., García, J., Milián, A. y Peix, A. 2003. Diagnóstico preclínico de la ateroesclerosis: función endotelial. *Revista Cubana de Medicina*, 42, 58-63.
- Gil, M., Tomás, F.A., Hess, B., Holcroft, D.M. y Kader, A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589.
- Guo, C., Wei, J., Yang, J. 2008. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutrition Research*, 28, 72-77.
- Guxens, M., Tomás, M., Elosua, R., Aldasoro, E., Segura, A. y Fiol, M. 2008. Asociación de los polimorfismos de la paraoxonasa 1 y la paraoxonasa 2 con el riesgo de infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología*, 61, 269-275.

- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R., McCarthy, A., Toker, L., Sussman, J. y Tawfik, D. 2004. Structure and evolution of the paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11, 412-419.
- Joven, J., Tous, M. y Rull, A. 2006. Experimentos con ratones susceptibles a arteriosclerosis. Ventajas, inconvenientes y aspectos que considerar. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 18, 155-163.
- Jurenka, J. 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review*, 13, 128-144.
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J. y Aviram, M. 2001. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *Nutrition*, 131, 2082-2089.
- Lansky, E.P. y Newman, R.A. 2007. *Punica granatum* L. (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 177-206.
- Lei, F., Zhang, X.N., Wang, W., Xing, D.M., Xie, W.D., Su, H. y Du, L.J. 2007. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity*, 3, 1023-1029.
- Malik, A. y Mukhtar, H. 2006. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle*, 5, 371-373.
- Medjakovic, S. y Jungbauer, A. 2013. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. *Food and Function*, 4, 19-39.
- Mertens, S.U., Jilma, P. y Rios, J. 2006. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8956-8961.
- Miguel, M.G., Neves, M.A. y Antunes, M.D. 2010. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties A short review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 25, 2836-2847.
- Mondragón, C., Juárez, S. 2008. Granada Roja: Guía para su producción en Guanajuato. INIFAP. *Folleto Técnico*. 46 p.
- Montes, D.H. 2004. Capacidad antioxidante total del plasma humano durante la reperusión en el infarto agudo del miocardio. Efecto de una mezcla de antioxidantes. Tesis de Maestría en ciencias en investigación clínica. Instituto Politécnico Nacional. México. 63 p.

- Navarro, R.J. 1999. Problemática de la aterosclerosis en México. *Revista Mexicana de Cardiología*, 10, 59-63.
- Neurath, A.R., Strick, N., Li, Y. y Debnath, A.K. 2004. *Punica granatum* L. (pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases*, 4, 41-52.
- Nidhi, G., Kirandip, G. y Surjit, S. 2009. Paraoxonases: structure, gene polymorphism and role in coronary artery disease. *Indian Journal of Medicinal Research*, 130, 361-368.
- Rashidi, A., Fatemeh, J.F., Akram, Z. y Zahra, S. 2013. Effect of concentrated pomegranate juice consumption on glucose and lipid profile concentrations in type 2 diabetic patients. *Journal Research Medicinal Sciences*, 15, 40-42.
- Rodríguez, F., Hernández, Y., Macías, A., Hernández, E., Medina, A. y Rodríguez, J. 2006. Sobre los genes paraoxonasa 1 y SR-B1, y su importancia en la aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología*, 59, 154-164.
- Rosenblat, M., Volkova, N., Coleman, R. y Aviram, M. 2006. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein e-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low density lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1928-1935.
- Rosenblat, M. y Aviram, M. 2011. Pomegranate juice protects macrophages from triglyceride accumulation: inhibitory effect on DGAT1 activity and on triglyceride biosynthesis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58, 1-9.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2013. Fecha de actualización: 2013. Fecha de consulta: 3 de Enero de 2014. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapperandview=wrapperandItemid=351.
- Sezer, E.D., Akcay, Y. y Llanbey, B. 2007. Pomegranate wine has greater protection capacity than red wine on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Medicinal Food*, 10, 371-374.
- Schubert, S.Y., Lansky, E.P. y Neeman, I. 1999. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 11-17.
- Shimada, M., Ishibashi, S., Inaba, T., Yagyu, H., Harada, K., Osuga, J.I., Ohashi, K., Yazaki, Y. y Yamada, N. 1996. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 7242-7246.

- Teixeira, J.A., Singh, T., Narzaryd, D., Vermae, N., Tarachand, D. y Ranade, S. 2013. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*, 160, 85-107.
- Tward, A., Xia, Y., Wang, X., Shi, Y.S., Park, C. y Castellani, L.W. 2002. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 106, 484-490.
- Valenzuela, A. y Morgado, N. 2006. Breve historia de la relación entre el colesterol y las enfermedades cardiovasculares. *Revista Chilena de Nutrición*, 33, 130-134.
- Van-Himbergen, T.M., Van Tits, L.J., Roest, M. y Stalenhoef, A.F. 2006. The story of PON-1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *The Netherlands Journal of Medicine*, 64, 34-38.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P. y Bassaganya, J. 2013. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 13, 1-18.