



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Instituto Nacional de Cardiología: Ignacio Chávez

Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal

**EFEECTO ANTIOXIDANTE DE LA *HIBISCUS SABDARIFFA LINNAEUS* EN LA
MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL EN UN MODELO EN RATAS CON
SÍNDROME METABÓLICO**

Tesis

Que para optar por el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Félix Leao Rodríguez Fierros

Tutor: Dr. Israel Pérez Torres

Instituto Nacional de Cardiología: Ignacio Chávez

Comité tutor: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dr. Francisco Jiménez Trejo

Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad de México septiembre 2021



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.

ÍNDICE:

1	ANTECEDENTES	3
1.1	<i>Patología del síndrome metabólico</i>	3
1.2	<i>Anatomía y fisiología renal</i>	5
1.3	<i>Estrés oxidante</i>	7
1.3.1	<i>Superóxido y Óxido nítrico</i>	7
1.3.2	<i>Superóxido dismutasa</i>	8
1.3.3	<i>Peróxido de hidrógeno y catalasa</i>	8
1.3.4	<i>Glutación reducido, oxidado y Glutación peroxidasa</i>	9
1.3.5	<i>Radical hidroxilo y el daño al ADN</i>	11
1.3.6	<i>Oxidación de proteínas (carbonilación)</i>	12
1.3.7	<i>Oxidación de lípidos (lipoperoxidación)</i>	13
1.3.8	<i>Glutación S Transferasa</i>	14
1.3.9	<i>Vitamina C</i>	14
1.4	<i>Daño oxidante al sistema renal</i>	14
1.5	<i>Antecedentes de la Hibiscus Sabdariffa Linnaeus en el síndrome metabólico</i>	15
1.6	<i>Antecedentes del modelo en ratas con SM</i>	16
2	JUSTIFICACIÓN	18
3	HIPÓTESIS	19
4	OBJETIVO GENERAL	19
5	OBJETIVOS PARTICULARES	19
6	MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1	<i>Animales y preparación de infusiones</i>	20
6.2	<i>Sacarosa al 30% e infusiones de HSL al 2%</i>	20
6.3	<i>Medición de presión arterial y obtención de orina</i>	20
6.4	<i>Determinación de la resistencia vascular renal (RVR)</i>	21
6.5	<i>Cuantificación de los marcadores de EO en el riñón</i>	22
6.6	<i>Cuantificación de la función renal</i>	26
6.7	<i>Morfología renal</i>	27
6.8	<i>Análisis estadístico</i>	27
7	RESULTADOS	28
7.1	<i>Características generales, bioquímica sanguínea y marcadores renales</i>	28
7.2	<i>Histología renal</i>	30
7.3	<i>Resistencia vascular renal (RVR)</i>	31
7.4	<i>Enzimas antioxidantes</i>	33
7.5	<i>Marcadores de estrés oxidante</i>	36
8	DISCUSIÓN	37
8.1	<i>Características fisiológicas</i>	37
8.2	<i>Efecto de la HSL al 2% sobre la función renal</i>	39
8.3	<i>Proceso oxidante/antioxidante</i>	43
9	CONCLUSIÓN	47
10	BIBLIOGRAFIA	48

ANTECEDENTES:

El síndrome metabólico (SM) es la asociación de tres o más patologías que se presentan en forma simultánea o secuencial en un individuo las cuales pueden ser: obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina (RI), dislipidemia y diabetes mellitus. Ocasiona alteraciones a diversos órganos y sistemas e incrementa el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares, renales, hepáticas e incluso la muerte prematura¹. La Federación Internacional de Diabetes (FID) estima que al menos un cuarto de la población mundial padece este síndrome, siendo utilizado como principal criterio para su diagnóstico, la obesidad². De acuerdo a datos de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), la Ciudad de México ocupa el primer lugar entre las ciudades de América Latina en la prevalencia para desarrollar diabetes mellitus y con esto la predisposición a padecer SM³.

En México, en el 2015 se realizó un estudio en niños obesos entre los 8 y 13 años de edad basados en los niveles de triglicéridos, RI, índice HOMA, peso al nacimiento y el índice de masa corporal para evaluar la probabilidad de generar SM, reportando que entre el 35 al 55% de los niños y jóvenes en México tienen una elevada probabilidad de generar este síndrome en su vida adulta⁴.

Patología del síndrome metabólico

La RI es la principal patología del conjunto de anormalidades que conforman el SM, ya sea por alteración genética propia del individuo o bien, adquirida por factores ambientales como el consumo inadecuado de alimentos con elevado contenido calórico, el sedentarismo que resulta en obesidad. La suma de estas alteraciones conlleva a una inadecuada captación de glucosa dependiente de insulina por parte de los órganos, como el hígado, el músculo y el tejido adiposo y se asocia a hiperglucemia, dislipidemias e hiperinsulinemia, es lo que provoca desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2)^{5,6}. En el tejido adiposo además existe alteración en la liberación de adipocitoquinas y de hormonas como la aldosterona y la angiotensina, así como la liberación de factores de coagulación que llevan a la disfunción endotelial, elevación de la presión sanguínea y a un estado protrombótico (Figura 1)¹.

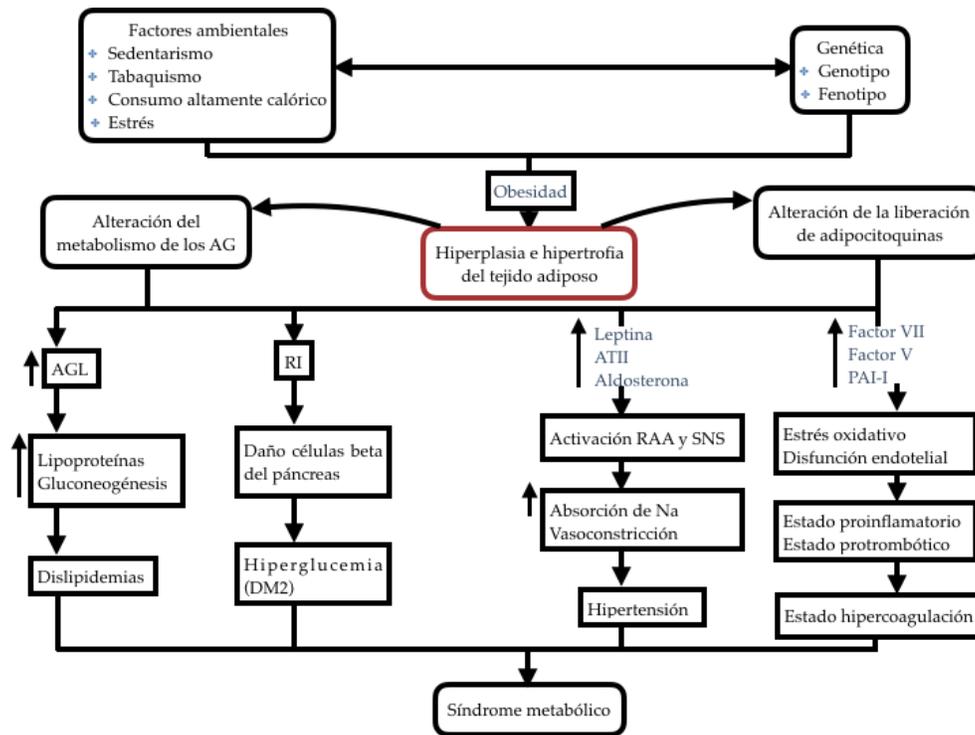


Figura 1. Fisiopatología del síndrome metabólico.

Además, el SM se relaciona con diversas complicaciones en otros órganos y sistemas que incluyen: síndrome de ovario poliquístico, insuficiencia cardíaca, trastornos respiratorios del sueño, deterioro cognitivo, cáncer y enfermedad renal crónica⁵. Particularmente a nivel renal, el SM se relaciona con microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, aumento de creatinina en sangre, atrofia tubular, fibrosis intersticial, arterioesclerosis y glomeruloesclerosis⁷.

La relación entre el SM y el daño renal principalmente se basa en la obesidad, en esta condición, el adipocito hipertrófico puede liberar citocinas proinflamatorias y ácidos grasos libres que impactan sobre el riñón ocasionando glomerulomegalia, glomeruloesclerosis, nefrolitiasis, alteración del flujo sanguíneo renal, así como la pérdida de la estructura morfológica de las nefronas, alteración del ultrafiltrado glomerular y proliferación celular renal^{7,8}.

Como se mencionó anteriormente, el SM ocasiona un estado proinflamatorio por la síntesis y liberación de adipocitoquinas, como la interleucina-6, factor de necrosis tumoral- α y proteína C reactiva que se asocian con fibrosis renal^{9,10}. Otra hormona que se incrementa en el SM es la leptina

la cual se ha relacionado con la producción de efectos profibróticos en las células mesenquimales, incremento del estrés oxidante (EO) y desarrollo de glomeruloesclerosis¹¹. El aumento de las adipocitoquinas se ha relacionado con enfermedad renal crónica (ERC) y el SM que al reducir la permeabilidad de los podocitos, provoca disfunción celular y albuminuria⁸. Otra hormona que se sintetiza en esta condición es la aldosterona, que induce mayor reabsorción de sodio que activa el sistema renina-angiotensina generando hipertensión. Esto provoca que se pierda el equilibrio vasoconstrictor y vasodilatador en la arteriola aferente debido al daño en el endotelio y provoca mayor presión intraglomerular y aumento en la tasa de filtración glomerular lo que altera y permite el paso de moléculas de alto peso molecular como la albúmina¹².

Anatomía y fisiología renal

La función del riñón consiste en remover las sustancias tóxicas productos del metabolismo celular a través de la filtración glomerular, además regula la presión arterial, la hemodinámica y el equilibrio ácido base del organismo¹³. El riñón está conformado por dos regiones: la corteza (externa) y la médula (interna). En la corteza surgen las columnas renales que al ingresar hacia la médula forman y separan a las pirámides renales, en el cual, el vértice de cada pirámide forma una papila que se sitúa dentro de un cáliz menor y al unirse con otros cálices menores forman al cáliz mayor y finalmente el conjunto de estos forman la pelvis renal que recoge la orina y la transporta hasta la vejiga donde se acumula hasta su vaciamiento (Figura 2-A)¹³.

La unidad fundamental del riñón es la nefrona conformada por el corpúsculo renal que integra al glomérulo, la cápsula de Bowman, las arteriolas aferentes y eferentes. También la nefrona contiene a los túbulos proximal, delgado, distal y colector¹⁴. La porción celular en el glomérulo está compuesta por células mesenquimales extraglomerulares (fagocíticas) e intraglomerulares que son contráctiles por receptores de Angiotensina II (Figura 2-B). Contiene podocitos, células endoteliales fenestradas y la lámina basal que juntos conforman el ultrafiltrado glomerular. El túbulo proximal reabsorbe glucosa, aminoácidos y proteínas; elimina solutos, fármacos y toxinas. Por su parte, el túbulo delgado absorbe agua y electrolitos y el túbulo distal conforma la mácula densa para integrar el aparato yuxtaglomerular que junto con la arteriola aferente y las células yuxtaglomerulares participan en el sistema renina-angiotensina para la secreción de aldosterona y la hormona antidiurética. Finalmente, el túbulo colector es la unión de varios túbulos para la formación de la orina¹⁴.

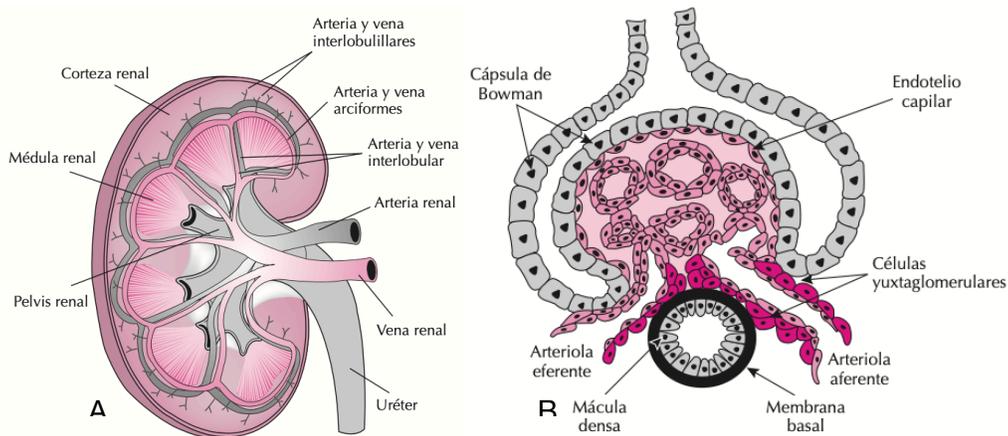


Figura 2: Estructura renal y corpúsculo renal (Tomado de Tresguerres, 2005)

La irrigación de la nefrona está conformada principalmente por la arteria renal que aporta la mayor cantidad de sangre al órgano y se bifurca para formar arterias que se subdividen en cinco segmentos vasculares. La primera, son las *interlobulares*, una por cada lóbulo que se continúan entre las pirámides renales hasta la unión corticomedular. Posteriormente las arterias *arqueadas* que forman un arco sobre la base de la pirámide y se ramifican para formar las arterias *interlobulillares* que ascenderán hacia la corteza (Figura 2-A), entran al glomérulo como la arteria *aférente*, forman el plexo capilar tipo fenestrado y descienden como arteria *eférente*¹³.

Por su parte, la innervación renal es simpática (adrenérgica) y parasimpática (colinérgica). La actividad simpática libera norepinefrina (Ne) y es a través de receptores adrenérgicos localizados en las arterias, el glomérulo y los túbulos renales que contribuyen a la vasoconstricción, regulan el flujo sanguíneo, la tasa de filtración glomerular, la reabsorción de sodio y agua, pero estimula además la liberación de renina en la zona yuxtaglomerular que participa en la presión sanguínea y en la perfusión renal¹⁵. Los receptores alfa-1, localizados en la vasculatura, nefronas y túbulos proximales son los que contribuyen a la vasoconstricción y reabsorción de sodio¹⁶. Por otro lado, los receptores alfa-2 unidos a proteínas G_i son responsables de regular el flujo sanguíneo al disminuir el AMPc a través del inositol trifosfato que moviliza el Ca^{2+} intracelular y provoca contracción del músculo liso modificando la resistencia vascular renal^{13,16}. La dopamina, precursor de la Ne participa de manera marginal al regular la vasodilatación y la reabsorción de sodio¹⁶. Por otra parte, la participación parasimpática del riñón es a través de la acetilcolina (Ach), por medio de receptores muscarínicos acoplados a proteína G, que libera moléculas de Ca^{2+} y activa la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) la cual cataliza la

conversión de L-Arginina y genera óxido nítrico (ON) que se une al grupo hemo de la hemoglobina, que activa a la guanilato ciclasa soluble y permite la entrada de Ca^{2+} a la célula a través del GMP a partir de GTP al disminuir la resistencia arterial tanto aferente como eferente siendo uno de los mecanismos fisiológicos de la vasodilatación renal.^{13,17}. Se ha descrito que la administración de fármacos como la Ach o Ne pueden regular la resistencia arterial renal por acción directa sobre el músculo liso arterial que altera el filtrado glomerular¹⁸.

Estrés oxidante

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno (ERO) también denominados radicales libres (RL) son moléculas químicamente reactivas que se producen de forma natural dentro de los sistemas biológicos, participan en diversas actividades celulares e inmunológicas que benefician al organismo^{19,20}. Sin embargo, el aumento excesivo conduce a EO el cual puede alterar el metabolismo celular por medio de daños acumulativos, disfunción y muerte celular llegando a ocasionar graves complicaciones o enfermedades como degradación de proteínas, daño al ADN celular, cáncer, enfermedades cardiovasculares y desordenes neurodegenerativos, entre otros^{21,22}.

- *Superóxido y Óxido Nítrico*

Las ERO se forman a partir del oxígeno molecular (O_2) en la mitocondria y a través de diferentes enzimas como la Xantina oxidasa, el citocromo P450 y por la vía del óxido nítrico (NOS). En la mitocondria el O_2 es liberado en la cadena transportadora de electrones en el complejo I y III de la membrana interna que, junto con la enzima NADPH oxidasa, cataliza la reacción y le transfiere un electrón desde el NADPH intracelular al O_2 para formar el primer y el principal ERO, el radical superóxido (O_2^-) siendo muy citotóxico, es abundante, común y altamente reactivo(Figura 3)^{20,22}.

La enzima citosólica Xantina oxidasa (XO) o Xantina deshidrogenasa (XDH) cataliza la reacción de xantina e hipoxantina a ácido úrico que reacciona con el O_2 mitocondrial para generar O_2^- y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)²³. Otro mecanismo, es a través de la autooxidación por medio de la familia de las enzimas citocromo P450 en el retículo endoplásmico que al contener iones de metales de transición (Fe-II, Cu-I), ocasiona intermediarios reactivos que pueden iniciar otros procesos oxidantes como la lipoperoxidación (LPO) y daño al ADN²³. El O_2 puede también reaccionar con el ON por la acción de la eNOS calcio dependiente, localizada en la membrana interna celular, esta enzima funciona como factor relajante derivado del endotelio y la reacción

puede conllevar a importantes consecuencias fisiológicas y patológicas como la propia eliminación del ON y con esto restringir su actividad como vasodilatador y de señalización celular o bien, al combinarse con el O_2^- genera peroxinitrito ($ONOO^-$) que causan LPO y fragmentación del ADN²³. El $ONOO^-$ pueden reaccionar con las hemoproteínas inhibiendo la capacidad de transportar electrones, mediante la inactivación de los complejos I y III de la cadena respiratoria que provoca el aumento de los niveles de O_2^- y otras ERO como el H_2O_2 que conlleva a la oxidación de proteínas y liberación de citocromo C al citoplasma propiciando la apoptosis celular^{23,24}.

- *Superóxido dismutasa*

Por otra parte, para eliminar los RL el organismo cuenta con un sistema antioxidante enzimático, entre estas enzimas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) que es la enzima antioxidante que detoxifica y protege a la célula contra las ERO al catalizar la dismutación de dos moléculas del O_2^- generado por medio de un cofactor metal en el sitio activo donde se realiza la reacción²⁵. Dependiendo del tipo de metal requerido como cofactor, existen dos isoformas de SOD, la primera unida al manganeso (Mn) en la que está localizada en las mitocondrias y la segunda junto al cobre y zinc (Cu-Zn) localizada en el citoplasma, siendo ésta última la que posee mayor presencia y distribución^{25,26}. El producto final de la dismutación del O_2^- con la enzima SOD es la generación de H_2O_2 .

- *Peróxido de hidrógeno y catalasa*

El H_2O_2 es una molécula capaz de difundirse a través de las membranas, posee vida media más larga, puede actuar como segundo mensajero en diferentes vías de señalización²⁷. Como molécula mensajera, difunde a través de las células en el citoplasma para iniciar efectos inmediatos, como cambios en la estructura celular, proliferación celular, reclutamiento de células inmunológicas y daño celular²⁸. La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante de estructura rígida, muy estable a la desnaturalización térmica y a la proteólisis, su papel principal es el de controlar o neutralizar la concentración y los efectos del H_2O_2 ²⁹. Su actividad es alta en hígado y eritrocitos, relativamente alta en el riñón y en tejido adiposo, intermedia en pulmón y páncreas, muy baja en corazón, cerebro y ausente en células vasculares del músculo liso^{29,30}. Se ha reportado que protege a la hemoglobina al eliminar más de la mitad del H_2O_2 generado en los eritrocitos, como factor inflamatorio, en la mutagénesis previene la apoptosis y como enzima antioxidante dependerá del

tipo de tejido y de la lesión tisular generada³⁰. Sin embargo, cuando hay bajas concentraciones de H₂O₂, la CAT conduce a una función menos específica capaz de inducir la vía peroxidativa en la que diversos donantes de hidrógeno (alcoholes, fenoles, hormonas, metales pesados y nitritos) que sirven como segundas moléculas reactivas para continuar con la oxidación y formar una tercera molécula ERO como el radical hidroxilo (OH⁻)²⁹.

- *Glutación reducido, oxidado y Glutación peroxidasa*

El glutación (GSH) es un tripéptido, antioxidante no enzimático, ampliamente distribuido en el citoplasma y puede reaccionar con el H₂O₂ por sí mismo, pero también al ser sustrato de la glutación peroxidasa (GPx) para formar el disulfuro de glutación (GSSG)³¹. Constituido por glutamato, cisteína y glicina, es sintetizado por la enzima glutamato-cisteína ligasa (GCL) y por glutamato sintetasa la cual utiliza una molécula de ATP para cada reacción. El GSH es el principal protector antioxidante de la célula al actuar como cofactor en diversas enzimas, es transportador de aminoácidos a través de la membrana plasmática y recolector de OH⁻ y O₂⁻ así como detoxificador de H₂O₂ y de LPO; además, su disponibilidad regenera otros antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C y E. Además, es capaz de volver a reducirse a través de la enzima glutación reductasa (GR) para disponer de más moléculas de GSH^{24,32}. Directamente está relacionado al EO ya que se ha demostrado que la expresión de GCL está regulada por el factor de transcripción Nrf2 (regulador de la expresión de proteínas antioxidantes e inflamación) que conduce a una mayor producción de GSH³².

La GPx además de detoxificar al H₂O₂ también desempeña un papel importante en la inhibición del proceso de peroxidación lipídica y por lo tanto funciona como protector de las células contra daño oxidante. Se ha reportado que hay al menos ocho tipos diferentes de isoformas de Gpx (GPx 1-8) siendo la GPx1 la selenoperoxidasa más abundante en todas las células y cuando existe disminución en su actividad, predispone a la pérdida del equilibrio antioxidante induciendo un incremento en el EO vascular que se relaciona al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y al cáncer²⁵. Por otra parte, la GR es una enzima específica que reduce al disulfuro de glutación-GSSG, reacción mediada por NADPH para formar dos moléculas GSH. Se reporta que el aumento de la actividad de la GR junto con la reducción de GSH, está relacionada con diversas enfermedades como fibrosis quística, VIH/SIDA, infecciones virales, neumonía, hepatitis, inmunosupresión generalizada, enfermedades neurodegenerativas y cáncer³³.

Figura 3: Ejemplificación de las reacciones oxidantes y antioxidantes.

MIM: Membrana interna mitocondrial, ON: Óxido nítrico, NOS: Óxido nítrico sintasa, ONOO⁻: Peroxinitritos, SOD: Superóxido dismutasa, Gred: Glutación Reductasa, GPx: Glutación Peroxidasa, GSH: Glutathion, GSSG: Disulfido de glutación, Aa: Aminoácidos, L[•]: Radical lipídico, LOO[•]: Peróxido lipídico, LOOH: Hidroperóxido lipídico, GST: Glutación S-transferasa, MDA: Malondialdehído, 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

- *Radical hidroxilo y el daño al ADN*

Además del O_2^- y del H_2O_2 existe otra principal ERO que es el radical OH^\cdot , se genera primeramente por medio de la reacción de Haber-Weiss al reaccionar con el O_2^- y con iones de hierro al reducir el ion férrico a ferroso ($Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$), la liberación de este ion ferroso participa en la reacción de Fenton al reaccionar con el H_2O_2 generando un ion y un OH^\cdot mientras que el hierro nuevamente se oxida ($Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$)³⁴. El OH^\cdot posee vida media muy corta, es altamente reactivo y dañino para las células que en condiciones de liberación excesiva de O_2^- , H_2O_2 y hierro hacen susceptible al organismo para que se lleve a cabo la reacción Fenton facilitando su producción²⁴.

En general, las altas concentraciones de ERO pueden ser importantes mediadores del deterioro a la estructura celular, a los ácidos nucleicos, los lípidos y a las proteínas; representan los primeros pasos involucrados en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento. Particularmente, el OH^\cdot reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, las bases púricas y pirimidínicas así como en la estructura de desoxiribosa²⁴. Hay tres principales tipos de reacciones del OH^\cdot (figura 4): 1) La extracción de hidrógeno como sucede en la reacción del OH^\cdot con el alcohol en la que el OH^\cdot extrae el hidrógeno para formar agua dejando un electrón desapareado en el átomo de carbono del alcohol, 2) Reacción del OH^\cdot que puede ser adherido al carbono de un doble enlace formando derivados hidroxilos y 3) Mecanismo en que el OH^\cdot forma parte en la reacción de transferencia de electrones³⁵.

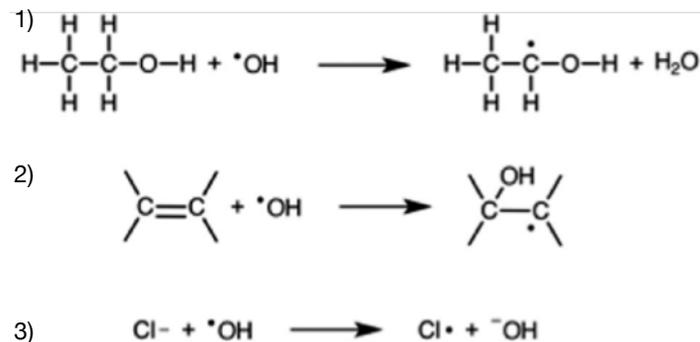


Figura 4: Tres principales reacciones del OH^\cdot 1) Extracción, 2) Adición y 3) Transferencia. (Tomado de Treml J. Et. al. 2016).

El daño en el ADN se reporta principalmente en la guanina que es la base más susceptible a la oxidación por ERO al perder un electrón y modificar su estructura molecular genera un aducto de ADN con el OH^- reduciéndose a 8-hidroxi guanina que permite la mutación de transversión de la Guanina-Citocina a Timina-Adenina asociándose con disfunción mitocondrial y carcinogénesis^{20,35}. La guanina también puede verse afectada al reaccionar con otros compuestos dañinos como el ácido hipocloroso (HOCl), cloroaminas, ácido hipobromoso, ON , peroxinitrito (ONOO^-), O_2^- y algunos metales pesados como el ion ferroso que pueden provocar la liberación de la desoxiribosa de la cadena dejándola sin uno de estos pares de bases y dañando la estructura del ADN la cual, se asocia como un potencial mutagénico^{20,21,24}. El OH^- también puede dañar los nucleótidos del ADN como el 5-hidroxiuracilo, la 5-hidroxicitosina y la 8-hidroxiadenina que se asocia con trastornos como la aterosclerosis, la carcinogénesis y la mutagénesis²⁰. También se ha reportado que el ARN está sujeto a oxidación al afectar la degradación del ARNm o al inhibir la traducción de proteínas²⁸.

- *Oxidación de proteínas (carbonilación)*

El daño oxidativo a través del OH^- puede también actuar en las proteínas alterando el funcionamiento de receptores, de anticuerpos, en la transducción de señales, proteínas de transporte y en algunas enzimas que pueden fragmentarse, reticularse y/o desnaturalizarse^{20,35}. Las modificaciones de proteínas se dan por la reacción oxidante directa a los aminoácidos como la lisina, arginina, prolina, treolina o bien, por un mecanismo secundario en los residuos proteicos como los que se presentan en la cisteína, metionina, histidina y lisina que reaccionan con compuestos carbonilos reactivos y conducen a la modificación de la estructura en el carbono formando dobles enlaces con el oxígeno (aldehídos y cetonas), enlaces disulfuros mixtos de los grupos tiol ($-\text{SH}$) y/o con los tioles de bajo peso molecular (S-glutación), en la que finalmente formarán grupos carbonilos^{24,36}. El principal daño oxidante es el que resulta del mal funcionamiento de la actividad proteica al alterar la traducción de proteínas y aumentar la proteólisis, mecanismos que se generan al evitar la agregación nociva de proteínas ya oxidadas y que se han reportado en una variedad de trastornos como la enfermedad de Alzheimer, trastornos pulmonares crónicos, falla renal crónica, diabetes o septicemias^{20,36}.

- *Oxidación de lípidos (lipoperoxidación)*

El proceso de oxidación de los lípidos ocurre a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) a través de una serie de reacciones en cadena con los RL llevando a cabo la reacción en tres etapas³⁷. El proceso inicia por la adición de un OH^- con el doble enlace del oxígeno o bien, por la remoción de un átomo de hidrógeno del AGP (Figura 4) en ambos casos, resulta en la formación de un radical lipídico (L^-)³⁵. La etapa de propagación es cuando el L^- reacciona con el oxígeno para formar el radical peróxido lipídico (LOO^-) que es altamente inestable. El LOO^- puede extraer una molécula de hidrógeno que proviene de otro AGP adyacente y producir hidroperóxido lipídico (LOOH) y un segundo L^- , en la que el LOOH puede reaccionar con iones metálicos (Fe^{2+}) produciendo un radical alcoxilo lipídico (LO^-). Tanto el radical LO^- y el LOO^- estimulan la reacción en cadena y de propagación para extraer átomos de hidrógeno adicionales no solo de los lípidos circundantes sino también de otras biomoléculas^{35,37,38}. Si la concentración de los radicales producidos (L^- , LO^- , LOO^-) es suficientemente alta, reaccionarán entre ellos para detener la reacción en cadena, eliminar los RL y creando moléculas no radicales o productos de degradación como alcanos, hidroxiácidos y componentes carbonílicos (cetonas y aldehídos)³⁷. Algunos de estos aldehídos son mensajeros secundarios, altamente reactivos y tóxicos como el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) que es el aldehído principal durante la LPO del ácido araquidónico y linoleico. Otro aldehído abundantemente formado es el malondialdehído (MDA) que puede determinarse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico durante los ensayos de TBARS siendo capaz de reaccionar con proteínas del ADN^{35,38}. El EO generado por los productos de la LPO tienen un papel principal en muchos procesos celulares como en la autofagia, el desacoplamiento de proteínas, en disfunción mitocondrial, daño en el ADN y en la apoptosis³⁸. En procesos fisiopatológicos se ha relacionado con isquemia/reperfusión, enfermedades inflamatorias, enfermedades hepáticas y en el vitiligo³⁹.

- *Glutación -S-Transferasa*

Se le denomina, Glutación -S-transferasas (GST) a la superfamilia de isoenzimas (alfa [α], Mu [μ], Pi [π], Omega [ω], Teta [θ], Delta [δ], Zeta [ζ], Sigma [σ], Kappa [κ] y mitocondrial [m]) multifuncionales localizadas en el citoplasma, mitocondrias, retículo endoplásmico, núcleo y en la membrana plasmática, que funcionan como enzimas protectoras de detoxificación celular de metabolitos endógenos, exógenos y de ERO⁴⁰. Esta detoxificación se realiza principalmente a través de la conjugación enzimática con el GSH que reacciona con los metabolitos tóxicos para convertirlos en compuestos mas solubles que puedan ser capaces de eliminarse del organismo⁴¹. Se ha reportado que la GST pueden reducir los niveles de LOOH y que pueden desintoxicar productos finales de la LPO como el 4-HNE, teniendo una función de enzima antioxidante⁴².

- *Vitamina C*

La vitamina C (VitC) o ácido ascórbico es un potente antioxidante hidrosoluble que elimina de forma natural una gran variedad de RL o de ERO al donar electrones y proteger a las células del daño oxidante⁴³. El ácido ascórbico se metaboliza primero como ascorbato aniónico que sufre de dos pérdidas posteriores de un electrón, para formar el radical ascorbato y el ácido deshidroascórbico. El ascorbato aniónico es un co-antioxidante con vitamina E que protege a las LDL de los radicales LOO⁻ y el radical ascorbato al ser poco reactivo, puede reducirse de nueva cuenta a ascorbato aniónico mediante NADH y NADPH o puede formar al acido deshidroascórbico, molécula que es de más fácil absorción y eliminación del organismo⁴⁴.

Daño oxidante al sistema renal

El EO tiene un papel fundamental en el daño renal ya sea de tipo agudo o crónico, se le ha relacionado como parte de la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, cáncer, diabetes, artritis y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y la enfermedad de Parkinson⁴⁵. La pérdida de la función renal a través de las ERO se debe a que provocan disfunción endotelial, pérdida en la estructura celular glomerular y tubular, procesos inflamatorios, fibrosis o por factores genotóxicos⁴⁶. Se reporta que las ERO que mayormente participan en el daño renal es el ON, el O₂⁻, el H₂O₂, los ONOO⁻ y con un menor nivel de oxidación los procesos generados por el OH⁻ como la oxidación de las proteínas y de los lípidos. Por su

parte, las enzimas antioxidantes que tienen mayor actividad a nivel renal son la SOD, catalasa, peroxidasa, el sistema antioxidante dependiente de glutatión⁴⁵.

Los daños oxidativos a nivel renal en el SM conducen a la disminución paulatina de la tasa de filtración glomerular y a la pérdida de la masa renal^{47,48}. En este cuadro, se ha descrito la participación del EO como mecanismo que contribuye al daño renal crónico al incrementar el O₂⁻ en la microvasculatura renal⁴⁹. En la obesidad, se liberan citocinas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que están parcialmente relacionadas en promover el daño renal,⁵⁰ particularmente el TNF- α , puede promover la producción de ROS en las células mesangiales lo que puede provocar apoptosis celular⁵¹. Estudios en roedores indican que una dieta alta en grasa condujo a disminución de las enzimas antioxidantes y del GSH y se correlacionaron con el aumento del MDA y de carbonilación⁵². Así mismo, el aumento en la glucosa en sangre promueve la glucosilación no enzimática de las proteínas formando productos de glucosilación avanzada que son altamente oxidantes, así como disminución de las enzimas antioxidantes como la CAT y la GPx⁵². Por su parte la aterosclerosis provoca la disminución de la actividad de SOD_{Cu-Zn} y de SOD_{Mn}⁵³. Además, se han reportado otros mecanismos potenciales dentro del SM que generan alteraciones renales como crecimiento del tejido conectivo, fibrosis, incremento del volumen glomerular, hipertrofia de podocitos, isquemia, daño microvascular con acumulación de triacilglicéridos y de ácidos grasos, que conllevan a disminuir la tasa de filtración glomerular, proteinuria y cambios histológicos como atrofia tubular, fibrosis intersticial y arterioesclerosis^{54,55}.

A pesar que se ha demostrado que el EO tiene un papel importante en el daño renal causado por el SM, la aplicación de antioxidantes como medida terapéutica clínica ha tenido un éxito limitado debido a la diversidad de los elementos que crean a los RL y por la interconexión dinámica generadoras de EO. En la medicina alternativa, con la *Hibiscus sabdariffa linnaeus* (HSL), se ha encontrado una fuente alimenticia generadora de grandes cantidades de antioxidantes naturales que pueden funcionar como un tratamiento para controlar el daño oxidante ocasionado en el riñón.

Antecedentes de la Hibiscus Sabdariffa Linnaeus en el síndrome metabólico

La HSL o también conocida como flor de jamaica, es una planta medicinal ampliamente usada en la medicina tradicional en Asia, África, América y en México; contiene polifenoles como las antocianinas, ácido protocatecuico, epigallocatequinas, resveratrol, así como flavonoides,

reportados como protectores contra las diferentes patologías que comprenden el SM⁵⁶. Se ha descrito que las antocianinas poseen actividad antioxidante al reducir el riesgo de enfermedades coronarias y de prevención para enfermedades crónicas y mejora la función de las enzimas CAT y GPx⁵⁷. El ácido protocatecuico, tiene efecto protector contra citotoxicidad y genotoxicidad al retardar la iniciación de la peroxidación lipídica inhibiendo al superóxido y al OH⁻ en los hepatocitos⁵⁸. Además, eleva la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y CAT inhibiendo también citocinas inflamatorias⁵⁹. Los flavonoides previenen la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares al prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y sus acciones hipocolesterolémicas⁶⁰. Otros componentes de la HSL son las catequinas que reducen la excreción de albúmina, así como la fibrosis producida en el riñón en ratas con diabetes⁶¹. También, se ha reportado que la epigallocatequina puede aliviar el daño renal en ratas diabéticas al disminuir la hiperglucemia, proteinuria y la LPO⁶². La HSL posee también otros componentes de acción rápida en el metabolismo como el resveratrol y los polifenoles que por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios pueden llegar a ser benéficos⁵⁶.

Se ha reportado en diversos estudios los efectos que posee diferentes fracciones de la infusión de HSL a nivel renal, por ejemplo, en el 2009, Wen-Chin y colaboradores, indicaron que el extracto de polifenoles obtenidos de la HSL mejora el intercambio hídrico y reduce el daño renal en ratas con diabetes inducidas con streptozotocina⁶³. De la misma manera, se reportó que al inducir el daño renal agudo con distintas dosis de cisplatino en ratas y al administrarles 1.6% de HSL en el agua de bebida, hay mejora en el filtrado glomerular, los niveles de nitrógeno no proteico y provee acción protectora antioxidante⁶⁴. Otro estudio demostró que la HSL disminuye la incidencia de infecciones en el tracto urinario en humanos al inhibir la infiltración de células inflamatorias en el riñón, la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias, las enzimas implicadas en la producción de prostaglandinas y del ON⁶⁵. Finalmente, estudios recientes indican que el extracto de antocianinas de la HSL al 1% reduce el daño renal crónico inducido por adenina y actúa como antagonista del EO en el proceso inflamatorio⁶⁶. Considerando lo anterior, aún no se ha reportado la utilización de la HSL sobre el EO en un modelo en ratas con SM.

Antecedentes del modelo en rata con SM

Para entender la causa, progresión y los agentes terapéuticos relacionados con el SM, se han desarrollado modelos experimentales a partir de roedores basado en dietas altas en

carbohidratos y/o grasas. En 1987, Hwang *et al.* indujeron hipertensión en ratas mediante el suministro de fructosa⁶⁷. Posteriormente en otro estudio, se observó que al alimentar ratas machos durante dos semanas con dieta al 60% de glucosa o sacarosa desarrollan algunas de las patologías que comprenden el SM como hipertensión, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia⁶⁸. En México, en éste mismo sentido en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH), se desarrolló en 1995 un modelo de SM en la rata Wistar a partir de la administración de azúcar comercial al 30% en el agua de bebida en un tiempo de 20-24 semanas en donde se observa la presencia de varias enfermedades implicadas en el SM^{69,70}. Sin embargo, cabe mencionar que este modelo ha sido modificado a través del tiempo, porque ha sido demostrado que en animales con mayor peso corporal (250-300 gr) las alteraciones metabólicas asociadas al síndrome son más agresivas⁷¹. Bajo éste mismo modelo experimental se ha podido realizar estudios relacionados con el SM y su relación con el EO.

JUSTIFICACIÓN:

Debido a que el SM es una enfermedad crónica progresiva y mortal que afecta a órganos y sistemas como el renal, en donde el EO esta involucrado en el proceso fisiopatológico de la enfermedad aunado a que se ha reportado que al administrar antioxidantes naturales provenientes de diversas plantas, pueden proveen defensas antioxidantes y mejorar la función vascular, con el presente protocolo se pretendió abarcar y ampliar la información sobre los beneficios antioxidantes de la infusión de HSL al 2 % en la modulación de la función renal en el SM y con esto proponer que la administración de la infusión de HSL puede ser utilizada como tratamiento alternativo, accesible y económico a la población mexicana que padece las complicaciones renales de este síndrome.

HIPÓTESIS:

Los antioxidantes proporcionados por el consumo de la infusión de HSL al 2% mejorará la función renal y su capacidad antioxidante en ratas con SM

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto protector de la infusión al 2% de HSL sobre el EO renal ocasionado por el consumo crónico de sacarosa en un modelo en rata con SM.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la resistencia vascular renal por medio de riñón aislado y perfundido según el método de Langerdoff
- Cuantificar la filtración glomerular
- Determinar los cambios histológicos
- Cuantificar la actividad de algunas enzimas antioxidantes tales como SOD, CAT, GPx, GST, GR, peroxidasas y GST
- Determinar los marcadores de EO como la lipoperoxidación, carbonilación y FRAP , GSH, Nitratos (NO_3^-) - Nitritos (NO_2^-) y Vitamina C
- Cuantificar los niveles de colesterol, triacilglicéridos, glucosa, insulina, índice HOMA y leptina en suero

MATERIAL Y MÉTODOS:

Animales y preparación de infusiones

Se utilizaron 40 ratas Wistar, macho con peso de 250 - 300gr, divididos en cuatro grupos con 8 animales cada grupo con tratamiento durante 12 semanas. El primer grupo control (C) se le administró agua de beber *ad libitum*. El segundo grupo de SM se le proporcionó sacarosa al 30% en el agua de beber *ad libitum*⁷². El tercer grupo sacarosa al 30% más HSL al 2% en el agua de beber *ad libitum*. Finalmente, al cuarto grupo control con HSL al 2% en el agua de beber *ad libitum* sin sacarosa. Todos lo grupos se les proporcionó alimento sólido comercial 5008.

Sacarosa al 30% e infusiones de HSL al 2%

La HSL se adquirió del municipio de Chilapa de Álvarez del estado de Guerrero, México. Para la preparación del agua con sacarosa al 30%, se pesó 300 gramos de azúcar comercial en un litro de agua y se homogeneizó durante 10 minutos hasta su completa disolución. La primera infusión de HSL: a 1 litro de agua en ebullición se le agregaron 20 gramos de flor de Jamaica la cual hirvió por 10 min., posteriormente se adicionó 300 gramos de azúcar comercial y se homogeneizó durante 10 minutos hasta su completa disolución. Para el grupo 4 el tratamiento se realizó igual que el procedimiento anterior pero no se agregaron los 300 gramos de azúcar comercial. En todas las preparaciones, se dejó atemperar y se le suministró como agua de bebida a las ratas.

Medición de presión arterial y obtención de orina

Al final del tratamiento y antes de sacrificar a los animales se les midió la presión arterial sistólica por medio del pletismógrafo (Narco Bio-system). El animal se ingresó en una cámara térmica durante aproximadamente 20 minutos. Posteriormente, se colocó un sensor en la cola del animal, conectado a un transductor de presión que envía señales a una computadora equipada con el software Siewart 1.1 para la captura y procesamiento de los datos. Antes del sacrificio, las ratas se pesaron y se colocaron en cajas metabólicas en ayuno de 24 horas, se recolectó la orina, se almacenó a -30°C y posteriormente se determinó la presencia de albuminuria por el método de verde bromocresol⁷³ y los niveles de creatinina.

Determinación de la resistencia vascular renal (RVR)

Se utilizó la técnica del riñón aislado y perfundido según Langendorff modificada por Vázquez-Cruz y colaboradores⁷⁴. A los animales anestesiados (pentobarbital sódico, 63 mg/kg de peso corporal, i.p.) se les practicó una incisión en la línea media, se visualizó la aorta, la arteria mesentérica y el riñón derecho. Se colocó un lazo laxo de seda 3-0 en la aorta abdominal sin comprimirla, por arriba de la arteria renal derecha y en la arteria mesentérica, se tensaron las ligaduras con pinzas hemostáticas, de inmediato se realizó la incisión en la arteria mesentérica, se introdujo un catéter y se atravesó la aorta; el catéter se introdujo en la arteria renal y se perfundió inmediatamente con solución Krebs mantenida a 37°C y aerada con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂) con la siguiente composición (mM): NaCl 118, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, CaCl₂ 1.2, MgSO₄ 4.2, glucosa 5.5, pH 7.4, inmediatamente después, se anudaron las ligaduras, se seccionó la vena cava y la aorta y por debajo de la arteria renal se cortó el uréter derecho en su extremo distal, y se extrajo el riñón.

La cánula del riñón derecho se removió y fijó al sistema para órgano aislado y perfundido. Inmediatamente después de haber sujetado al riñón, se inició la calibración del flujo de la solución amortiguadora, hasta obtener un flujo constante entre 9-10 mL/min de salida que se controló por medio de una bomba peristáltica (MasterFlex, Easy-load II. ColeParmer No 77200-50), que mantuvo una presión de perfusión de 70 a 90 mmHg. La presión de perfusión se midió por medio de un transductor de presión (Grass Telefactor). El transductor se conectó a un polígrafo Grass 79D que amplificó la señal y se registró en una computadora equipada por un programa especializado (Grass PolyView versión 2.0).

Después de un periodo de 20 minutos de equilibrio, se procedió a inyectar bolos de fármacos vasodilatadores y vasoconstrictores, lo que se administraron a intervalos aproximadamente de entre 10 y 20 minutos para permitir que la presión de perfusión retorne al nivel basal (entre 70 y 90 mmHg).

Las secuencias y concentraciones de los bolos fueron: 2µM de NE, 2µM de Ach + 2µM de Ne, 50µL de H₂O₂, y finalmente 2µM de Ne + 50µL de H₂O₂. Los niveles de presión en mmHg se registraron cada minuto durante ocho minutos continuos de perfusión por cada bolo, dejando un descanso de aproximadamente cinco minutos entre cada bolo.

En el modelo de riñón aislado y perfundido según Langendoff, se valora la reactividad vascular inducida por la perfusión de distintos bolos que representen cambios en la resistencia de la arteria renal que indiquen vasodilatación o vasoconstricción. De acuerdo a la teoría biogénica menciona que el flujo sanguíneo renal es igual a la presión arterial dividida por la resistencia vascular renal a medida que aumenta la presión, los vasos incrementan su resistencia, este mecanismo es intrínseco y autorregulado en condiciones renales normales, pero hay un desequilibrio en condiciones patológicas, por lo que al aumentar la resistencia arteriolar preglomerular por acción de la vasodilatación o vasoconstricción, la tasa de filtración glomerular será afectada⁷⁵.

Cuantificación de los marcadores de EO en el riñón

El riñón derecho se disecó y se mantuvo en hielo con solución de Krebs, pH 7.4 a 37°C y se congeló a -30°C hasta su proceso. Posteriormente, el riñón se homogeneizó en hielo utilizando un politron junto con solución de sacarosa pH 7.35 en presencia de inhibidores de proteasas. Se centrifugó a 5,000 rpm y a 4°C durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante para determinar el daño oxidante y las enzimas antioxidantes. La cantidad de proteínas total se determinó por el método de Bradford⁷².

- ***Determinación de la lipoperoxidación***

Esta prueba se basa en la reacción del malondialdehído, producto secundario de la oxidación de los ácidos grasos de tres o más ligaduras con el ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y a alta temperatura, generando un producto de coloración rosa⁷⁶. Para esta medición se utilizaró el equivalente a 1 mg de proteína de cada muestra por duplicado, al cual se le agregó a cada muestra 50 µL de butilhidroxitolueno (BHT) al 4% más 1 mL de fosfato monobásico (KH₂PO₄) pH 7.0, se homogeneizó en el vórtex durante 5 segundos y se incubó 30 minutos en baño María a 37 °C, al final de la incubación se agregaron 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8 M y se incubó en baño María a 100 °C durante 45 minutos. Después de ese tiempo y para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo y se agregó 1mL de NaCl, se homogeneizó en el vortex durante 15 segundos, después se agregaron 4 mL de n-Butanol, se colocaron en vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después se

extrajo la fase de n-Butanol y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 532 nm. La curva de calibración se realizó utilizando tetraetoxipropano⁷⁷.

- *Determinación de los niveles de oxidación de proteínas*

Para medir la carbonilación de proteínas, se añadió 2 mg de proteína del homogeneizado del riñón y se le agregaron 500 µL de HCl al 2.5 N o 500 µL de dinitrofenilhidrazina (DNT) al 0.01 M, se mezcló de forma vigorosa y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante una hora, agitándose en vórtex cada 15 minutos. Al concluir la incubación, se le agregaron 500 µL de ácido tricloroacético al 20% y la mezcla se centrifugó a 15000 RPM durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y en el precipitado se realizaron tres lavados con 500 µL de etanol/acetato de etilo dejando reposar durante 10 minutos entre cada lavado para permitir la eliminación del DNT mezclando y centrifugando a 15000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se añadió 1 mL de clorhidrato de guanidina 6 M con KH_2PO_4 al 20 mM pH 2.3 y se incubó nuevamente a 37 °C durante 30 minutos. La absorción final se leyó en un espectrofotómetro a 370 nM utilizando aire como blanco⁷⁸.

- *Determinación de Nitratos y Nitritos*

Esta determinación se reportó previamente por Pérez-Torres *et al.*, 2009. En un 1 mg de proteínas del homogeneizado de riñón se agregó 100 µL de Sulfato de Zinc (ZnSO_4) al 10% y 100 µL 0.5N de Hidróxido de Sodio (NaOH) y se centrifugó a 5000 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se incubó con 400 µL del reactivo de Griess (200 µL 1% sulfanilamida y 200 µL 0.1% de N-1-naftil-etilenediamina). El volumen total se ajustó a 1 mL. La curva de calibración de obtuvo con solución de Nitrito de Potasio (KNO_2) en el rango de 10-0.156 nmoles /mL. La absorbancia se midió a 540 nm.

- *Determinación de la enzima glutatión (GSH)*

Para determinar la concentración del GSH, las muestras primero se desproteinizaron, ya que las proteínas intervienen con la cuantificación del GSH. Tomando 1 mg de proteína del homogeneizado del riñón se le añadieron 100 µL de KH_2PO_4 0.05 M pH 7.35, más 100 µL de tungstato de sodio al 5% y se agregó 100 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.33 M, se homogeneizó

en el vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. Después de la centrifugación se traspasó el sobrenadante y se agregaron 700 μL de KH_2PO_4 más 100 μL de reactivo de Ellman (5,5'-Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico) 10M. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos y la absorbancia se leyó a 412 nM. La calibración de la curva fue realizada con GSH de 5 a 25 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína

- *Evaluación de la capacidad antioxidante del sistema no enzimático (FRAP)*

Consiste en la reacción de los antioxidantes presentes en la muestra y el cloruro de hierro (Fe III) en un medio ácido, formando ion ferroso (Fe II), el cual se une al 2,4,6,-Tris(2-pyridil-s-triazine) (TPTZ) para generar un compuesto de color azul. A 1mg de proteína del homogeneizado de riñón de cada muestra, se le agregó 1.5 mL de mezcla de reacción; que consistió en 300 mM de amortiguador de acetatos pH 3.6, 20 mM de hexadidrato de cloruro férrico (FeCl_3), 10 mM de TPTZ en HCl en una proporción de 10:2:1 v/v respectivamente; se mezcló en el vórtex durante 5 segundos y se incubó a 37°C por 15 minutos en la oscuridad, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm. La absorbancia se midió a 593 nm en el espectrofotómetro (UNICO UV 2100). La curva de calibración se obtuvo con trolox a una concentración final en nM.

- *Determinación de Vitamina C (VitC)*

Se tomó 1 mg de proteína del homogeneizado de riñón y se agregaron 400 μL de ácido tricloroacético al 10%, esta mezcla se homogeneizó en el vórtex durante un minuto y después se colocó en hielo, este proceso se repitió por un lapso de 5 minutos, posteriormente se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 200 μL del reactivo de Folly (compuesto por fenol reactivo y agua destilada en proporción 1:1). Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó mediante espectrofotometría a 760 nm.

- *Determinación de enzimas antioxidantes: Catalasa, SOD extracelular y peroxidasas*

Se realizó la separación de las enzimas catalasa, SOD y peroxidasas mediante geles nativos de poliacrilamida para evaluar la actividad de las mismas, mediante la técnica descrita por Laemmli (1979)⁷⁹. El gel concentrador al 4% se preparó con 3.036 mL de agua desionizada y destilada, 1.250 mL de amortiguador pH 6.8, 0.664 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 100

μL de persulfato de amonio y $10 \mu\text{L}$ de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel resolvente al 8% se elaboró con 4.730 mL de agua desionizada y destilada, 2.500 mL de amortiguador pH 8.9, 2.730 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, $100 \mu\text{L}$ de persulfato de amonio y $10 \mu\text{L}$ TEMED. Los geles se cargaron con $20 \mu\text{L}$ de amortiguador de muestra de gel nativo, $13 \mu\text{L}$ de catalasa bovina a una concentración de 100 ng como estándar más el equivalente de 1 mg de proteína del homogeneizado de riñón, para la actividad de SOD se tomó $25 \mu\text{L}$ de SOD bovino a una concentración de $1 \mu\text{g}$ como estándar y el equivalente a un 1mg de proteínas de homogeneizado de riñón, mientras que para la actividad de las peroxidasas se cargaron $10 \mu\text{L}$ de amortiguador de muestra de gel nativo, $45 \mu\text{L}$ de peroxidasa a una concentración de 229.5 μg como estándar más el equivalente a 1 mg de proteína del homogeneizado de riñón. La electroforesis se corrió en un amortiguador de tris-glicina pH 8.3 a 100 voltios.

Al término de la electroforesis y para determinar la actividad de la catalasa, se dejó incubar con H_2O_2 al 30% durante 20 minutos posteriormente con una mezcla de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) al 1% y cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) al 1% durante 10 minutos en la oscuridad. Finalmente, el gel se lavó tres veces con agua⁷²

Para observar la actividad de la SOD, el gel se lavó tres veces con agua destilada durante 5 minutos, para después incubarse con 2.45 mM de nitroazul de tetrazolio (NBT) por 20 minutos, se decantó la solución de NBT y se incubó en una solución de EDTA 28 μM , riboflavina 0.028 μM , amortiguador de fosfatos 36 mM pH 7.8 durante 20 minutos, posteriormente fue expuesto a una lámpara de luz UV durante 3 minutos, se realizaron tres lavados y se dejó incubando con agua destilada durante 48 horas⁷².

Para determinar la actividad de las peroxidasas el gel se lavó con agua destilada tres veces durante 5 minutos y se reveló de acuerdo a la modificación del método de Abrams y Webster⁸⁰ incubando con una mezcla de 0.003mg/mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina disuelta en una solución de etanol:ácido acético: agua (1:1:1 v/v) con H_2O_2 durante 10 minutos en la oscuridad. Los geles fueron analizados por densitometría con el analizador de imágenes Kodak Image 3.5 y los cálculos para estimar la actividad enzimática se realizaron de acuerdo a lo descrito por Chen⁸¹.

- *Actividad de la glutatión peroxidasa*

La actividad de la enzima GPx se determinó indirectamente por la cantidad de NADPH oxidado, esta reacción requiere de GSH cuya disponibilidad a su vez depende de la actividad de la

GR, la ausencia del NADPH se monitorea mediante el uso de espectrofotometría. Para medir la actividad de la GPx, se utilizó el equivalente a 1 mg de proteína de cada muestra suspendidos en 2.4 mL de amortiguador de fosfatos (KH_2PO_4) 50 mM (pH 7.0), adicionado con NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y GR 1 UI/mL. La mezcla se leyó en un espectrofotómetro (UNICO UV 2100) a 340 nM y se dejó estabilizar durante 1 minuto a 37°C, después de ese tiempo se adicionó el H_2O_2 y se leyó inmediatamente en un intervalo de 7 minutos⁸².

- *Actividad de la glutatión reductasa*

Para evaluar la actividad de la GR se utilizaron 2400 mL de KH_2PO_4 0.1 mM con 0.5 mM de EDTA pH 7.4, 300 μL de NADPH 0.1 mM y se le agregó el equivalente a 1 mg de proteína del homogeneizado de riñón. Se incubó y monitoreó la actividad de la enzima durante 7 minutos a 37°C y la absorbancia se leyó a 340 nm. La actividad de la GR se expresa en U/min/mg de proteína.

- *Actividad de la glutatión -S- transferasa*

Para evaluar la actividad de la GST se utilizaron 2400 mL de KH_2PO_4 (0.1M, pH 6.5) más 300 μL de GSH 0.1 mM y 300 μL 1-cloro-2,4 dinitrobenzono (CDNB) 0.1 mM, posteriormente se le añadieron el equivalente a 1 mg de proteína del homogeneizado del riñón. La muestra se incubó y monitoreó a 340 nm durante 7 minutos a 37°C. Los valores de la GST se expresan en U/min/mg. Una unidad de actividad de GST se expresa en μmol de conjugado de GS-DNB formado/min/mg de proteína.

Cuantificación de la función renal

La sangre se obtuvo directamente de la aorta previo a la realización de la técnica de riñón aislado y perfundido, se centrifugó a 3,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se obtuvo el suero, en este se determinó los niveles de creatinina sérica y junto con lo niveles de creatinina urinaria y con el volumen recolectado de orina de 24 horas se calculó la depuración de creatinina utilizando la siguiente fórmula:

$$(Crea_urinaria / Crea_sérica (Volumen_orina)) / 1440 \text{ minutos}$$

Además, en el suero se determinó la química sanguínea de colesterol, triglicéridos, glucosa, insulina, índice HOMA ($Insulina_{basal} \times Glucosa_{basal} / 22.5$) y los niveles de leptina, la proteinuria se determinó usando el reactivo verde bromocresol.

Morfología renal

Una fracción del riñón se procesó bajo las técnicas convencionales de histología y se tiñó con tricrómica de Masson y metenamina de Jones. El análisis de la morfología se evaluó mediante un microscopio Carl Zeiss acoplado con una cámara digital de 9 megapíxeles y analizadas por densitofotometría mediante el programa Sigma Scan pro5.

Análisis estadístico

El análisis se realizó con el programa Sigma Plot 14 y se obtuvo la media de los datos con su desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante la prueba ANOVA de una vía y con la prueba de Pos hoc de Tukey tomando una significancia de $p \leq 0.5$. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar.

RESULTADOS:

Características generales, bioquímica sanguínea y marcadores renales

Cuadro 1: Indicadores bioquímicos y metabólicos (En rojo se marcan las diferencias significativas entre

Grupo	Peso (gr)	Presión (mmHg)	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	TAG (mg/dL)	Insulina (ng/mL)	HOMA	Leptina (ng/mL)
Control	414.9 ± 25.2	117.9 ± 4.2	119.6 ± 27.1	46.1 ± 6.0	52.5 ± 13.1	5.3 ± 1.4	2.0 ± 0.5	1.9 ± 0.5
SM	569.6 ± 122.5 [§]	141.4 ± 6.0 [§]	178.7 ± 102.6	51.5 ± 5.0	139.5 ± 72.6 [§]	17.6 ± 3.5 [§]	9.9 ± 5.1 [§]	13.5 ± 7.8 [§]
SM+HSL	418.8 ± 21.6 [§]	131.4 ± 4.0 ⁺	128.5 ± 21.7	51.2 ± 2.3	74.1 ± 16.7 ⁺	11.6 ± 3.2 ⁺	4.2 ± 0.8 [*]	3.6 ± 0.8 [§]
C+HSL	313.0 ± 25.9 [§]	115.4 ± 6.0	113.0 ± 15.8	45.3 ± 7.0	46.7 ± 13.7	5.0 ± 3.2	1.6 ± 0.4	3.0 ± 0.5 [§]

C, SM+HSL vs. SM: * $p \leq 0.05$, + $p \leq 0.01$, § $p \leq 0.001$. (n=8), resultados expresados en media ± error estándar. Abreviaturas: TAG=Triacilglicéridos, HOMA=Indicador de resistencia a la insulina, SM=Síndrome Metabólico, HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linaleus*, C+HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linaleus* control. los grupos).

En el cuadro 1 se muestran las características fisiológicas generales y los valores de bioquímica sanguínea obtenidos de los animales experimentales. Las ratas con SM presentaron diferencias significativas en el peso ($p \leq 0.001$), presión arterial sistólica ($p \leq 0.001$), hipertrigliceridemia ($p \leq 0.001$), hiperinsulinemia ($p \leq 0.001$), aumento del índice HOMA ($p \leq 0.001$) e hiperleptinemia ($p \leq 0.001$) al compararse con el grupo control. Por su parte, en las ratas con SM más el tratamiento de HSL comparadas con las ratas con SM presentaron disminución significativa de la ganancia de peso ($p \leq 0.001$), presión arterial ($p \leq 0.01$), así como de los niveles de triglicéridos ($p \leq 0.01$), insulina ($p \leq 0.01$), índice HOMA ($p \leq 0.05$) y de leptina en sangre ($p \leq 0.001$). Para el grupo control más HSL, se observó diferencia significativa en el peso ($p \leq 0.001$) y aumento en los valores de leptina ($p \leq 0.001$) comparadas con el grupo control. Los valores de glucosa y colesterol no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos.

Cuadro 2: Indicadores de función renal (En rojo se marcan las diferencias significativas entre los grupos)

Grupo	Peso riñón (gr)	Agua (mL/24h)	Orina (mL/24h)	CrS (mg/dL)	CrU (mg/dL)	Depuración (mL/min)	Albuminuria mg/mL
C	1.19 ± 0.05	13.75 ± 3.5	13.6 ± 7.1	0.4 ± 0.07	10.8 ± 3.1	2.5 ± 1.0	32.3 ± 16.6
SM	1.29 ± 0.1	38.12 ± 22.0*	24.0 ± 11.9*	0.70 ± 0.07 ⁺	3.9 ± 1.0 [‡]	1.4 ± 0.4 ⁺	73.6 ± 16.6 [‡]
SM+HSL	1.27 ± 0.1	35.00 ± 14.4	27.0 ± 9.4	0.38 ± 0.06 ⁺	6.7 ± 3.3 ⁺	2.7 ± 1.6*	43.1 ± 22.6 ⁺
C+HSL	1.11 ± 0.2	23.12 ± 9.2*	23.0 ± 18.0	0.38 ± 0.03	12.2 ± 6.7	2.6 ± 2.3	44.9 ± 19.3

C, SM+HSL vs. SM: * $p \leq 0.05$, $^+p \leq 0.01$, $^{\ddagger}p \leq 0.001$. (n=8), resultados expresados en media \pm error estándar
Abreviaturas: CrS=Creatinina sérica, CrU= Creatinina urinaria, SM=Síndrome Metabólico, HSL=Hibiscus Sabdariffa Linaleus, C+HSL=Hibiscus Sabdariffa Linaleus control

En el cuadro 2 se describen los marcadores de función renal. Las ratas con SM mostraron deterioro de la función renal al presentar aumento significativo de la creatinina sérica ($p \leq 0.01$), menor creatinina en la orina ($p \leq 0.001$) menor depuración ($p \leq 0.01$), así como diferencia significativa ($p \leq 0.001$) en la albuminuria en comparación con el grupo control. Además, las ratas con SM mostraron aumento en la cantidad de orina ($p \leq 0.01$) así como mayor consumo de agua ($p \leq 0.01$) comparadas con el grupo control. Por su parte, en las ratas del grupo SM+HSL al compararse con las ratas con SM, presentaron aumento en la tasa filtración glomerular al depurar mayor cantidad de creatinina ($p \leq 0.01$) mostrando como resultado menor cantidad de creatinina en el suero ($p \leq 0.01$) junto con aumento de la liberación de creatinina en la orina ($p \leq 0.01$) así como reducción en la cantidad de albuminuria ($p \leq 0.01$). Las ratas del grupo 4 únicamente mostraron un ligero aumento del consumo de agua ($p \leq 0.01$) comparadas con el grupo control.

Histología renal

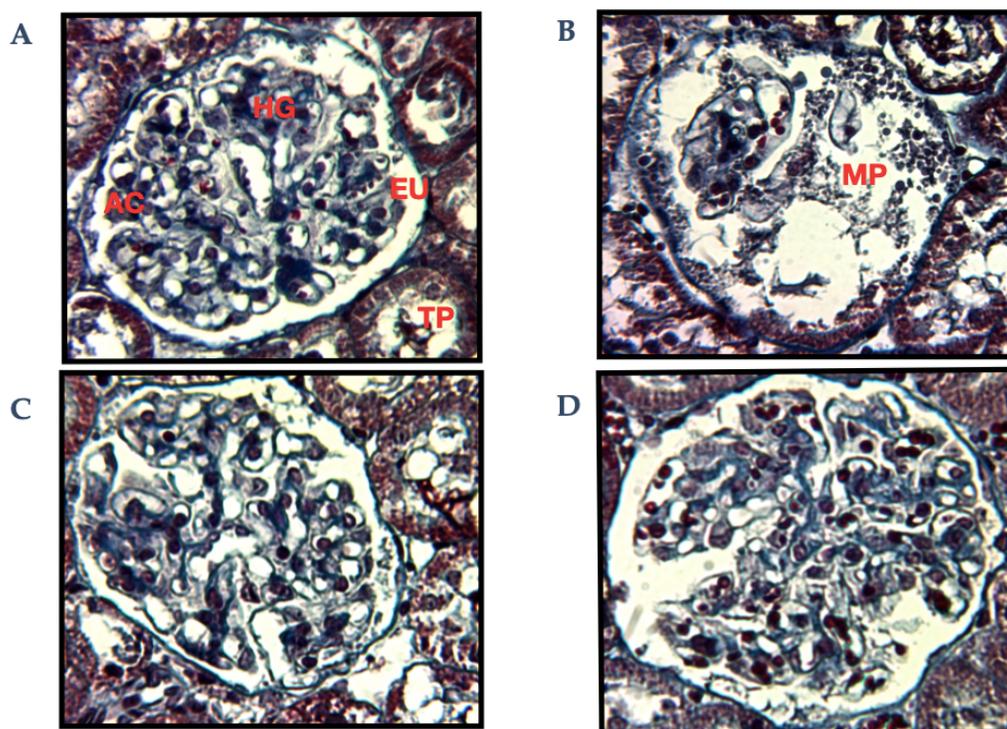
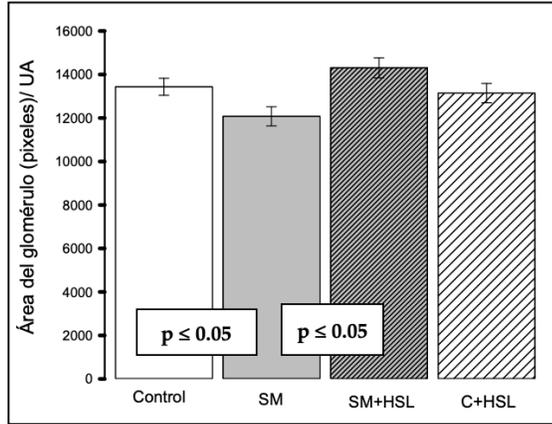


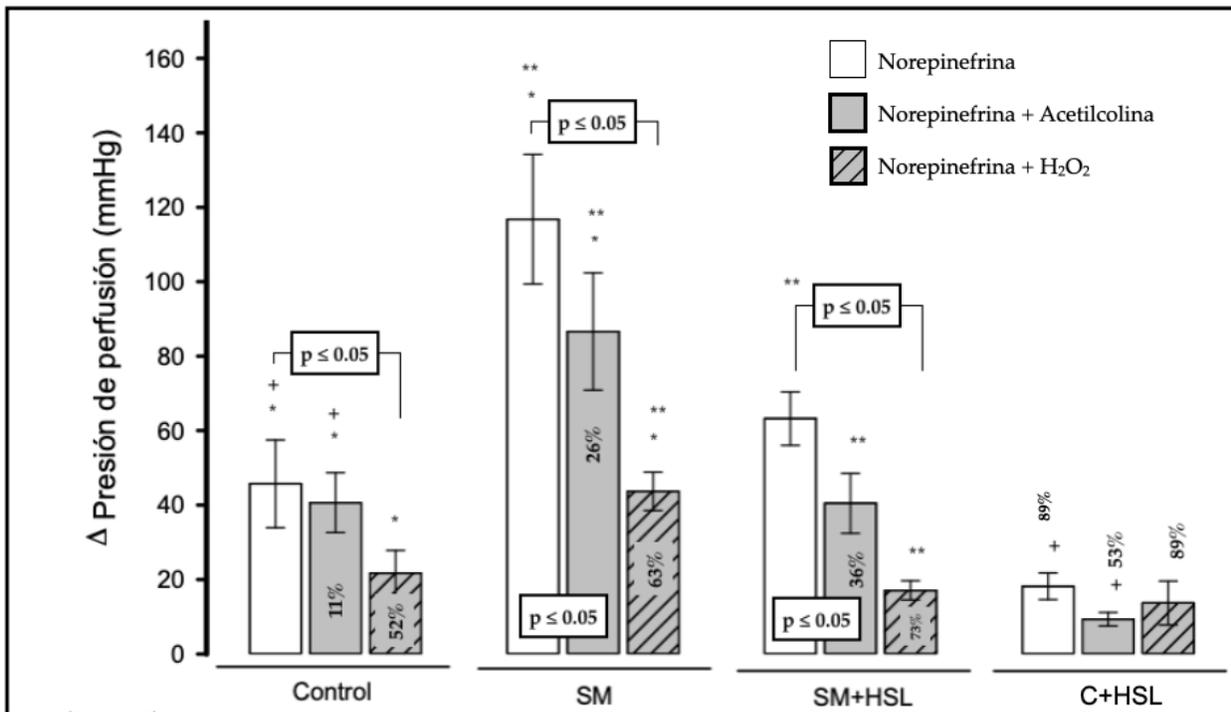
Figura 5: Cortes histológicos representativo de un glomérulo en cada uno de los grupos experimentales. Técnica de Masson (40x). Abreviaturas: A=Control, B=SM, C=SM+HSL, D=C+HSL. HG: Hilio glomerular, AC: Asas capilares, EU: Espacio urinario, TP: Túbulo proximal, MP: Material proteináceo.

La figura 5 muestra los cortes histológicos representativos de un glomérulo de cada uno de los grupos de las ratas experimentales. En las que las ratas con SM presentaron retracción del lecho vascular, fibrosis, detritus celular e incremento del espacio urinario, que en los grupos restantes no se observan estas mismas características celulares. En la gráfica 1 muestra el tamaño promedio del lecho vascular de cada uno de los grupos y se observa que las ratas con SM presentaron disminución significativa del tamaño del glomérulo en comparación con el grupo control ($p \leq 0.05$). Las ratas con SM+HSL presentaron aumento en el tamaño del glomérulo a diferencia del grupo con SM ($p \leq 0.01$). Los glomérulos del grupo 4 no mostraron diferencia significativa al compararse con el grupo control.



Gráfica 1: Representación del área del lecho vascular renal en cada uno de los grupos

Resistencia vascular renal (RVR)

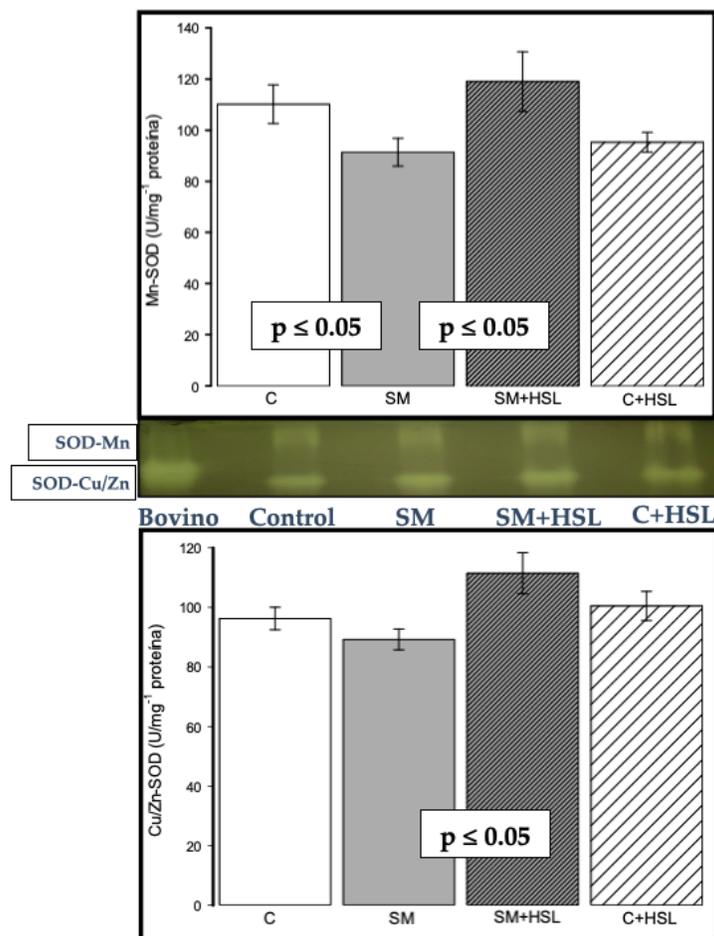


Gráfica 2: Valores de la Δ de la presión de perfusión en el riñón ejercida por vasoconstrictores (NE), vasodilatadores (Ach) y el H₂O₂ sobre la resistencia vascular renal. (n=8), resultados expresados en media \pm error estándar *C vs SM ($p \leq 0.05$), **SM vs SM+HSL ($p \leq 0.05$), +C vs HSL ($p \leq 0.05$)

La gráfica 2 muestra los cambios de la Δ de la presión de perfusión en el riñón la cuál se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) al perfundir 20 μ M de NE en el riñón de las ratas con SM en comparación con las ratas control (116.8 ± 49.1 mmHg vs. 45.7 ± 33.3 mmHg). El tratamiento con HSL en las ratas con SM+HSL mostró reducción significativa ($p \leq 0.05$) de la Δ de la presión

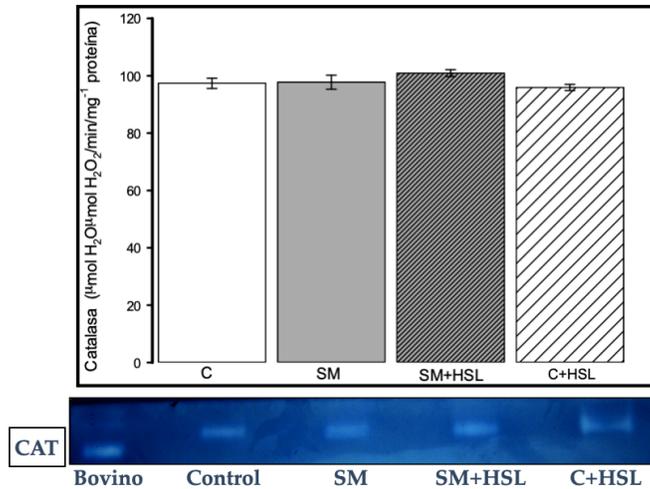
de perfusión al administrar NE (20 μ M) comparado con las ratas con SM (63.2 \pm 20.2 mmHg vs. 116.8 \pm 49.1 mmHg). En el caso del grupo de las ratas control+HSL, al administrar 20 μ M NE no mostraron disminución significativa en la Δ de la presión de perfusión comparada con las ratas control (18.2 \pm 10.1 mmHg vs. 45.7 \pm 33.3 mmHg). Al perfundir 20 μ M de NE y 20 μ M de Ach, en las ratas control la Δ de la presión de perfusión disminuyó en un 11% aunque la variación no fue significativa. La Δ de la presión de perfusión decreció en el riñón de las ratas con SM (26%) en comparación con la presentada únicamente con NE, con diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Al inhibir la vasoconstricción con Ach en el riñón de las ratas control y con SM, la Δ de la presión de perfusión fue significativamente mayor que la presentada en las ratas control ($p \leq 0.05$) al mostrar la Δ de la presión de perfusión de 40.6 \pm 22.8 mmHg vs 86.6 \pm 44.4 mmHg, respectivamente. Por su parte, en las ratas con SM+HSL los valores obtenidos al agregar Ach mostró disminución en la Δ de la presión de perfusión de hasta un 36% al compararse únicamente con NE ($p \leq 0.05$) además, mostró disminución de la Δ de la presión de perfusión al compararse con las ratas con SM (40.4 \pm 22.8 mmHg vs. 86.6 \pm 44.5 mmHg), con diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Al perfundir H₂O₂ más NE, se observó en el grupo control disminución de la Δ de la presión de perfusión en 52% al compararse con NE ($p \leq 0.05$) sin presentar diferencia significativa. Sin embargo, en el grupo de SM se presentó disminución significativa de la Δ de la presión de perfusión de hasta 63% al compararse con la vasoconstricción presentada únicamente con NE ($p \leq 0.05$). Cuando se comparó éste mismo efecto del H₂O₂ en cada uno de los grupos experimentales se observó que en las ratas con SM la Δ de la presión de perfusión fue mayor que en las ratas control (43.7 \pm 14.6 mmHg vs. 21.7 \pm 17.2 mmHg) presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Por otro lado, en el grupo SM+HSL presentó disminución en la Δ de la presión de perfusión en 73% comparado con el mismo grupo pero al perfundir únicamente con NE ($p \leq 0.05$) también mostró disminución significativa en la Δ de la presión de perfusión ($p \leq 0.05$) al administrar NE+H₂O₂ y compararse con las ratas con SM (17.1 \pm 7.2 mmHg vs. 43.7 \pm 14.6 mmHg).

Enzimas antioxidantes



Gráfica 3 y 4: Actividad de la enzima SOD_{Mn} (A) y de la enzima SOD_{Cu/Zn} (B) representada en gel de acrilamida (n=8) por mg de proteína en homogeneizado de riñón. Resultados expresados en media \pm error estándar. Abreviaturas C=Control, SM=Síndrome metabólico, HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linnaeus*.

Las gráficas 3 y 4 muestran la actividad de las isoformas de SOD. En el panel A se presenta la actividad de la SOD_{Mn} en el homogeneizado de riñón de los grupos experimentales, en las ratas con SM se observó disminución de la actividad de SOD_{Mn} en comparación con el grupo control ($p \leq 0.05$) pero en las ratas con SM+HSL, se incrementó la actividad de la SOD_{Mn} significativamente en comparación con la de las ratas con SM ($p \leq 0.05$). En el grupo de las ratas control+HSL no mostró diferencia significativa. Por su parte, la expresión de SOD_{Cu/Zn} no mostró cambios significativos en el grupo de las ratas control comparada con las ratas con SM, pero la actividad de SOD_{Cu/Zn} se incrementó significativamente entre las ratas en comparación con el grupo SM+HSL y las ratas con SM ($p \leq 0.08$). Las ratas control+ HSL no mostraron cambios relevantes en comparación con las ratas control.

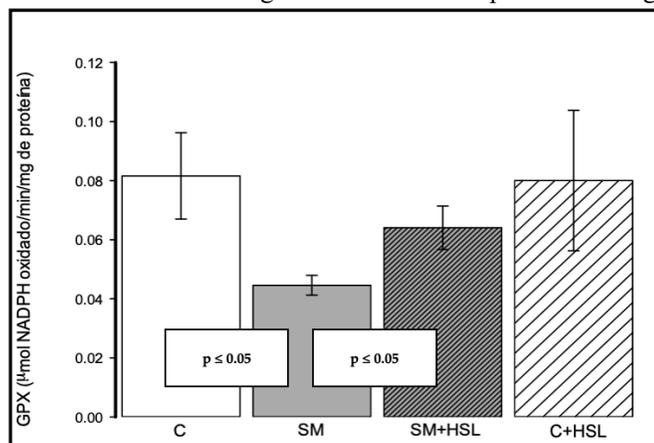


Gráfica 5: Actividad de la enzima Catalasa en homogeneizado de riñón representado en gel de acrilamida (n=8), resultados expresados en media \pm error estándar. Abreviaturas: C=Control SM=Síndrome metabólico, HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linnaeus*.

En la gráfica 5 se muestra la actividad de la enzima catalasa que no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales.

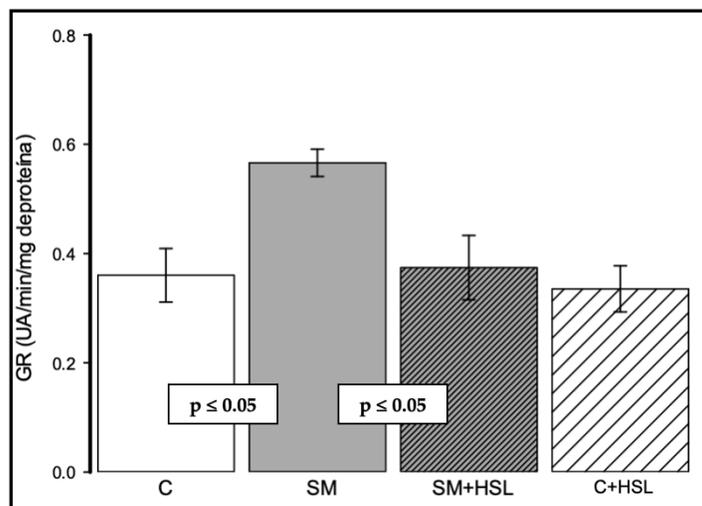
Por su parte, la actividad de las peroxidasas (gráfica 6) no mostró cambios significativos en las ratas con SM contra las ratas control, pero en las ratas con SM+HSL mostró incremento significativo ($p \leq 0.008$) comparadas con las ratas con SM. Sin embargo, la expresión de la GPx disminuyó significativamente ($p \leq 0.01$) en las ratas con SM en comparación con las ratas control y se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) en las ratas con SM+HSL, comparadas con las ratas SM. En el grupo de las ratas del grupo 4 no se encontraron diferencias significativas.

Gráfica 6: Actividad de la GPx/minuto en homogeneizado de riñón representado en gel de acrilamida. (n=8),



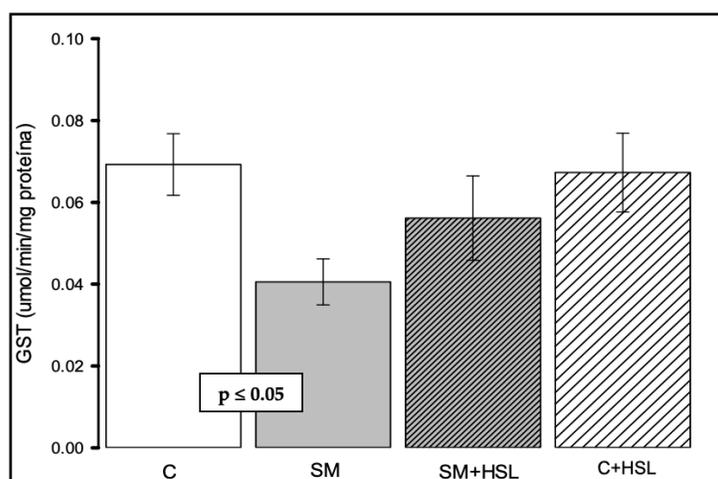
resultados expresados en media \pm error estándar. Abreviaturas: GPx=Glutación Peroxidasa, C=Control SM=Síndrome metabólico, HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linnaeus*.

La actividad de la enzima GR se muestra en la gráfica 7, fue significativamente mayor en las ratas con SM ($p \leq 0.02$) comparadas con las ratas control. En las ratas con SM+HSL se presentó disminución significativa ($p \leq 0.01$) en la actividad de la enzima al compararse con las ratas con SM. No hubo diferencias significativas con el grupo HSL control.



Gráfica 7: Actividad de la enzima Glutacion Reductasa del homogeneizado de riñón representado por espectofotometría. (n=8), resultados expresados en media \pm error estándar. Abreviaturas: GR=Glutación Reductasa, C=Control SM=Síndrome metabólico, HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linnaeus*.

La actividad de la GST (gráfica 8) fue significativamente menor ($p \leq 0.05$) en las ratas con SM comparadas con las ratas control. Sin embargo, mostró una tendencia a incrementarse, pero sin alcanzar diferencia significativa en las ratas con el tratamiento de SM+HSL al igual que las ratas con control+HSL.



Gráfica 8: Actividad de la enzima GST en homogeneizado de riñón en los grupos experimentales (n=8), resultados expresados en media \pm error estándar. Abreviaturas: GST=Glutación -S-transferasa, C= Control SM= Síndrome metabólico, HSL= *Hibiscus Sabdariffa Linnaeus*.

Marcadores de estrés oxidante

Cuadro 3: Indicadores de EO en el homogeneizado de riñón (En rojo se marcan las diferencias significativas entre los grupos).

Grupo	LPO (nM/MDA)	Carbonilación (ng/carbonilos)	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻ (nM)	GSH (nM)	TAC (nM/Trolox)	VitC (μM)
Control	0.38 ± 0.2	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.0015 ± 0.0004	0.6 ± 0.05	0.020 ± 0.006
SM	0.54 ± 0.1*	0.11 ± 0.02 ⁺	0.06 ± 0.03	0.0009 ± 0.0004 ⁺	0.5 ± 0.03	0.016 ± 0.003
SM+HSL	0.48 ± 0.2*	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.01 ⁺	0.0013 ± 0.0002*	0.6 ± 0.03	0.018 ± 0.002
C+HSL	0.29 ± 0.2	0.09 ± 0.02*	0.10 ± 0.01	0.0014 ± 0.0005	0.6 ± 0.06	0.021 ± 0.004

C, SM+HSL vs. SM: *p ≤ 0.05, ⁺p ≤ 0.01, [‡]p ≤ 0.001. (n=8), resultados expresados en media ± error estándar. Abreviaturas: LPO=Lipoperoxidación, NO₃⁻/NO₂⁻=Nitratos/Nitritos, GSH=Glutation, TAC, por sus siglas en inglés=Capacidad antioxidante total, VitC=Vitamina C, HSL=*Hibiscus Sabdariffa Linaleus*, C+HSL= *Hibiscus Sabdariffa Linaleus* control

Los indicadores de EO en el homogeneizado de riñón mostraron aumento significativo en la LPO ($p \leq 0.05$), carbonilación ($p \leq 0.01$) y disminución en la concentración de GSH ($p \leq 0.01$) en el grupo de las ratas con SM respectivamente, comparados con el grupo control. Por otro lado, los indicadores de LPO ($p \leq 0.05$,) y de GSH ($p \leq 0.05$,) en el grupos con SM+HSL mostraron diferencias significativas comparados con el grupo de SM y a pesar de que no se observó diferencia significativa en los niveles de carbonilación, se aprecia tendencia en la disminución en los valores. Los valores de NO₃⁻/NO₂⁻ disminuyeron significativamente en las ratas tratadas con SM+HSL comparada con las ratas con SM. Los valores de FRAP y Vitamina C no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

El SM conforma la suma de alteraciones patológicas como, hipertensión, dislipidemias RI. Sin embargo, la etiología principal es el sedentarismo y una mala alimentación que resulta en obesidad. El SM ha llevado a cobrar la vida de miles de personas cada año en todo el mundo, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos y accesibles es de gran interés para la investigación aplicada y clínica. Como parte del proceso fisiopatológico del SM, el EO participa tanto en el daño celular como en las alteraciones hemodinámicas que a largo plazo llegan a afectar la función renal y con esto, la complicación de la enfermedad⁷. Se han realizado diversos estudios para contrarrestar el daño ocasionado por los radicales libres utilizando medicina tradicional, como la infusión de HSL en la que se ha demostrado que disminuye el EO en hígado y corazón de ratas con SM^{72,79}. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto protector de la infusión de HSL sobre el EO en el riñón ocasionado por el consumo crónico de sacarosa en el modelo en rata con SM. Los resultados de este estudio sugieren que el consumo de HSL al 2% disminuye la hipertensión, la dislipidemia y la RI, además de mejorar la hemodinamia renal al presentar disminución de la Δ de la presión perfusión que resulta en el aumento de la filtración glomerular. Además, la infusión de HSL mostró disminución del EO en el riñón.

Características fisiológicas

De acuerdo a nuestros resultados, el grupo con SM presentaron aumento de peso, hipertrigliceridemia e hipertensión en el cual en un estudio similar de Baños *et al.* (1997) y Pérez-Torres *et al.* (2019) en ratas con SM desarrollaron las mismas características^{70,72}. Por su parte, las ratas del grupo SM+HSL al 2% presentaron disminución de peso y menores niveles de TAG a comparación con las ratas SM. Este efecto puede atribuirse a los polifenoles, flavonoides y a la curcumina de la HSL ya que se ha reportado que poseen efectos hipolipidémicos que en el caso de los polifenoles y flavonoides inhiben la acumulación de grasa al disminuir los oxisteroles en el metabolismo de los ácidos biliares, bloquean la acumulación de los lípidos en el hígado y aumentan la excreción de ácido palmítico en las heces^{83,84}. Zúñiga-Muñoz *et al.* (2013) reportó que la pérdida de la grasa intra-abdominal y los niveles de TAG, se debe a la disminución de la lipogénesis debido al +/- hidroxicitrato (+/- HCA) que al transformarse en -/- HCA inhibe la enzima extramitocondrial ATP-citrato-liasa que cataliza la ruptura de citrato para obtener oxaloacetato y acetil-CoA, paso

importante para la síntesis de grasas; así como también inhibe la formación de malonil-CoA que estimula la actividad de la carnitina transferasa que disminuye la lipogénesis y aumenta la oxidación de los lípidos y/o de la glucogenogénesis⁷⁹.

Por otro lado, a pesar de que los niveles de glucosa permanecieron sin cambios en todos los grupos, la hiperinsulinemia y el índice HOMA fueron más altos en las ratas con SM en comparación con las del grupo control, pero al administrar HSL al 2% se observó que estos valores fueron menores a comparación de las ratas con SM, en las que este efecto puede deberse a la presencia de cianidina 3 glucosido que es capaz de disminuir la expresión de adipocitocinas proinflamatorias (MCP1 y TNF α) y esto permite la expresión del transportador GLUT4 en el tejido adiposo que facilita el transporte de glucosa al interior de los adipocitos y en el músculo esquelético^{86,87}.

La leptina es una adipocitocina involucrada en el gasto energético, en la inflamación, en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. En este estudio los resultados mostraron que las ratas con SM presentaron hiperleptinemia a comparación del grupo control. Se ha reportado que niveles aumentados de leptina en suero tienen relación positiva con el SM y con aumento en el índice HOMA que se relaciona directamente con el aumento en la acumulación del tejido graso⁸⁸. Cuando se administró HSL al 2% se observó disminución de los valores de leptina lo que sugiere que la HSL tiene efecto directo en el tejido adiposo al inhibir la acumulación de lípidos citoplásmicos y en la diferenciación de los preadipocitos^{56,79}. Por su parte, Diez-Echave *et al.* (2020) demostraron que al administrar entre 10 y 25 mg/kg/día de extracto de HSL a ratones durante 6 semanas, se reducían los niveles de ARNm de la leptina en la grasa, Joven *et al.* (2014), por su parte reportaron que al administrar 125 mg/kg/día durante 4 semanas en pacientes con SM disminuyó los niveles de leptina y aumentó los niveles de adiponectina, hormona que participa en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos^{89,90}. Al inhibir los niveles de leptina, sugiere que el extracto de HSL puede ser efectivo para reducir el proceso inflamatorio relacionado con la obesidad⁹¹

Las ratas con SM presentaron incremento en la presión arterial sistólica, se ha descrito que debido a la obesidad hay liberación de las adipocitoquinas que activan el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA), que conduce a mayor absorción de sodio renal y menor disponibilidad del ON lo que altera la vasodilatación dependiente del endotelio induciendo el incremento de la presión sanguínea^{5,17,70}. El tratamiento con HSL presenta efectos

antihipertensivos que se han atribuido a las antocianinas (delfinidina-3-O-sambubiósidos y cianidina-3-O-sambubiósido) a través de dos mecanismos: el primero debido a la inhibición del efecto diurético similar a la aldosterona al incrementar la eliminación de agua y natriuresis y el segundo ocasionado por la estimulación de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)^{72,79}. Por otro lado, Riaz *et al.* (2018) recopilan dos mecanismos adicionales: uno a través de la activación de la vía relajante del ON/GMPc derivado del endotelio que implica la disminución del flujo de iones de Ca²⁺ en las células del músculo liso vascular y el otro debido a la estimulación del efecto relajante dependiente del endotelio mediante la activación de la lípido quinasa que conduce a la fosforilación de la eNOS⁹². Joven *et al.* (2014) además informaron que los polifenoles pueden inducir en vías celulares endoteliales, respuestas favorables y que, junto con la actividad antioxidante y antiinflamatoria, son los mecanismos mas importantes de la HSL en comparación con la diuresis y la inhibición de la ECA⁹⁰.

Efecto de la HSL al 2% sobre la función renal

Las ratas con SM mostraron deterioro de la función renal al presentar mayores niveles de creatinina en sangre y menor depuración de creatinina en orina, además se observó albuminuria a diferencia del grupo control. De acuerdo a diversos reportes, las características patológicas del SM como la acumulación de tejido graso y la activación del sistema RAA son las principales causas de deterioro renal, que resulta en mayor presión intraglomerular, alteración de la tasa de filtración que conlleva a la disminución de la depuración de creatinina, el aumento de creatinina en sangre y el paso hacia la orina de sustancias de alto peso molecular como la albúmina^{8,9}. De acuerdo con Pérez-Torres *et al.* (2009) la administración de sacarosa al 30% en ratas con SM desarrollan proteinuria, disminución de la permeabilidad glomerular y glomeruloesclerosis⁶⁹. En las ratas del grupo con SM+HSL al 2% se observó mejora en la función renal al presentar menor concentración en los niveles de creatinina en sangre y aumento en la depuración de creatinina y menores niveles de albuminuria a diferencia del grupo con SM.

Se ha reportado que cuando se induce daño renal con doxorubicina (quimioterapéutico nefrotóxico) o con adenina (sustancia nefrotóxica) y se administra entre 500 y 700 mg/kg⁹² o 50mg/kg de HSL⁶⁶ respectivamente, se observa disminución en los niveles de creatinina en sangre, mayor depuración de creatinina y disminución de proteínas en la orina ocasionado por la presencia de antioxidantes de la HSL. Las antocianinas incrementan la tasa de filtración glomerular al inhibir

la producción de angiotensina II y por los efectos vasodilatadores de quercetina y el eugenol de la HSL que incrementan el flujo renal mejorando el funcionamiento glomerular debido a la liberación de ON^{94,95}. De la misma manera, la HSL inhibe la albuminuria y aumenta la depuración de creatinina causada por nefropatías en ratas obesas y diabéticas^{96,97}.

- *Histopatología renal*

Nuestros resultados mostraron que las ratas con SM tuvieron alteraciones histológicas como la retracción del lecho vascular y el incremento del espacio urinario, que de acuerdo a Yang *et al.* (2013) describieron en un modelo en ratas con diabetes tipo 2 que los riñones presentan ligera hipertrofia glomerular, congestión vascular, acumulación de colágeno y fibrosis⁹⁷. Por su parte, Khattab *et al.* (2016) reportaron que las ratas con nefropatía inducida con doxorrubicina presentan vacuolización de túbulos renales, congestión glomerular, hipertrofia, edema perivascular, dilatación quística y material eosinofílico en los túbulos, así como escasa presencia de proteínas en el espacio de Bowman⁹³. Por su parte, Perez-Torres *et al.* (2009) en un modelo en rata con SM, reportaron que los cambios histopatológicos presentan zonas mesangiales con matriz aumentada e hiper celularidad, así como disminución de la luz capilar y zonas de esclerosi s⁶⁹. A diferencia de nuestros resultados, las ratas con SM no mostraron acumulación de colágeno, zonas de esclerosi s o infiltración celular pero si se observó la pérdida de la estructura glomerular al colapsar el hilio renal y al aumentar el espacio de Bowman, dilatación de los capilares, ligera hiper celularidad, presencia de material proteináceo en el espacio glomerular, fibrosis y detritus celular. Trujillo J *et al.* (2018) reportan que estas alteraciones conducen a la disminución de la función renal en pacientes con SM⁹⁸. En este estudio, el grupo SM+HSL mostró menores cambios histopatológicos renales en comparación con las ratas del grupo con SM.

Chou *et al.*, (2016) reportaron que en ratones con inflamación renal inducida con lipopolisacáridos, al administrar HSL en el agua de bebida se reducen las variaciones histológicas como la inflamación tubular⁶⁵. Por otro lado, Badreldin *et al.* (2016), reportaron que al administrar extracto de los cálices de HSL al 5 y 10% en ratas con daño renal crónico inducidas con adenina, reducían los cambios histológicos como inflamación y/o fibrosis⁶⁶.

- *Resistencia vascular renal*

Los resultados obtenidos en el riñón aislado y perfundido mostraron que la NE en las ratas con SM aumenta la Δ de la presión de perfusión en comparación con el grupo control, esto podría deberse por la pérdida de la estructura morfológica del riñón que conlleva a que se pierda el equilibrio vasoconstrictor y vasodilatador en la arteriola aferente lo que provoca mayor presión intraglomerular⁹. Se ha reportado que el efecto de la Ne sobre la función renal es a través de los receptores alfa 2-adrenérgicos al regular el paso del Ca^{2+} intracelular por medio del AMPc, que provoca la contracción del músculo liso de las arterias aferentes y eferentes que conllevan a la disminución del calibre de los vasos sanguíneos renales resultando en el aumento de la resistencia vascular renal^{13,15,16,99}. Correia *et al.* (2000), mencionaron que la NE actúa dentro de la médula renal al inhibir los mecanismos antihipertensivos como la reducción de la liberación de renina, la presión natriurética y al afectar la liberación de una supuesta hormona depresora de la médula renal¹⁰⁰. Sin embargo, cuando se perfundió en el grupo de las ratas con SM+HSL y control+HSL, se observó que la Δ de la presión de perfusión era menor que la presentada en las ratas con SM y en las ratas control respectivamente. Esto concuerda con los resultados de Rahma *et al.* (2018), quienes reportaron que las ratas diabéticas tratadas con extracto de HSL, mostraron menor grado de contracción vascular cuando se perfundía NE en aortas aisladas a diferencia del grupo control¹⁰¹. Por su parte, Pérez-Torres *et al.* (2019) informaron que el extracto de HSL en corazones aislados modula los efectos inotrópicos negativos a través de la acción antagonista sobre el receptor adrenérgico β y que el efecto de la HSL disminuye el daño ocasionado en el endotelio vascular y que está asociado con la disminución de la presión arterial⁷⁶.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, cuando se administró Ne+Ach, se observó disminución de la Δ de la presión de perfusión en cada uno de los grupos, a pesar de que en el grupo con SM disminuyó en un 26% comparada con la presentada únicamente con Ne. Dow *et al.* (2016), reportaron que, en personas con SM sin presencia de obesidad, cuando se administra Ach, esta provoca disfunción vasodilatadora endotelial similar a las personas únicamente con obesidad, indicando que el SM está asociado directamente con la disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio lo que impide la regulación del tono vascular debido al daño endotelial ocasionado por la propia enfermedad¹⁰². Nuestros datos comprueban el daño endotelial presentado en las ratas con SM y que a pesar de la administración con Ach, no logra atenuar la Δ de la presión

de perfusión en los riñones a valores fisiológicos. Sin embargo, a las ratas con SM+HSL, cuando se les administró Ne + Ach disminuyó hasta en un 36% comparada únicamente con NE, así como también hay menor Δ de la presión de perfusión cuando se comparó con el grupo de ratas con SM. Estos datos nos indica la participación de la HSL como regulador de la Δ de la presión de perfusión disminuyendo la resistencia vascular renal como lo reporta Gholamnezhad *et al.* (2018) en la que indican que la HSL posee efectos antihipertensivos mediados por mecanismos similares a los de la Ach, así como efectos vasorrelajantes directos¹⁰³. Así mismo, se han descrito los mecanismos en los que la HSL actúa como antihipertensivo a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, como efecto diurético, a través del ON, por disminución del flujo de Ca^{2+} en el músculo liso vascular, por factores colinérgicos y/o histaminérgicos, por reducción de la distancia de difusión entre capilares y miocitos, así como por la formación de nuevos vasos sanguíneos¹⁰⁴.

Al perfundir el Ne+H₂O₂ se observó disminución de la Δ de la presión de perfusión en el grupo control, al compararse con Ne+Ach y en los grupos SM y SM+HSL tanto con Ne como con Ne+Ach, indicando que el H₂O₂ posee efectos vasodilatadores inclusive mejores que la Ach. Se ha mencionado que el H₂O₂ actúa como vasoconstrictor en arterias de menor calibre para regular la presión sanguínea¹⁰⁵, desempeña un papel fundamental como vasodilatador de arteriolas de submucosas¹⁰⁶ o incluso como vasoconstrictor y vasodilatador al regular la presión sanguínea en el músculo esquelético ya sea en condiciones fisiológicas y patológicas¹⁰⁷, por lo tanto, su efecto dependerá del lecho vascular o del vaso sanguíneo sobre el que esté actuando. Park *et al.* (2015) reportaron por medio de la respuesta oxidativa en la S-glutationilación en ratas, que el H₂O₂ activa los canales de potasio sensible a 4 aminopiridina lo que conlleva a que se cierren los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes produciendo hiperpolarización lo que provoca la relajación del músculo liso arterial¹⁰⁸.

Adicionalmente, el efecto de la HSL, al administrar Ne+Ach, mostró disminución de la Δ de la presión de perfusión indicando que la HSL se relaciona con el aumento en la tasa de filtración glomerular y la liberación de solutos a través de la orina, como lo indica Riaz *et al.* (2018) en la que reportan los efectos diuréticos ocasionados por las antocianinas que inhiben a la ECA reduciendo los niveles de aldosterona y la reabsorción de solutos en el riñón incrementando su liberación a través de la orina⁹². Otro mecanismo diurético de la HSL es explicado por la liberación de ON que a su vez produce vasodilatación renal mediante la liberación de Ca^{2+} , mediada por la quercetina y eugenol presentes en el extracto de HSL¹⁰⁹.

Proceso oxidante/antioxidante

En el presente estudio los resultados mostraron disminución de las enzimas antioxidantes SOD_{Mn}, SOD_{Cu/Zn}, GPx, peroxidasas y la GST en el riñón de las ratas con SM, enzimas que están asociadas con la generación de EO cuando hay disminución en su actividad⁵². A pesar de que SOD_{Cu/Zn} no mostró diferencia significativa ambas enzimas, tanto SOD_{Mn} como SOD_{Cu/Zn} presentaron disminución en su actividad en las ratas con SM lo que pudiera estar relacionado con la incapacidad de controlar las ERO como O₂⁻. Se debe de considerar que la SOD_{Mn} es la enzima más importante para la protección contra las ERO en el cuerpo humano²⁶. Estudios recientes (Liu *et al.*, 2020), han demostrado que la disminución de la actividad de la SOD está asociada con el SM independientemente del envejecimiento celular, de los marcadores de el EO, así como de los factores de riesgo dietéticos, actuando incluso como un predictor de este síndrome¹¹⁰. A pesar de esto, se observó también disminución en los niveles de GSH en las ratas con SM siendo este el principal protector antioxidante de la célula al detoxificar el OH, O₂⁻, H₂O₂ y LPO³². Por su parte, Baños *et al.*, (2005), reportaron que las ratas con SM hay reducción o inactivación de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx en el plasma y en el corazón¹¹¹. Nuestros resultados muestran que las ratas con SM presentaron disminución de la actividad de las peroxidasas y de la GPx que de acuerdo a Samsam *et al.*, (2014) la actividad de las peroxidasas se reduce de manera significativa en personas con SM, asociándose con EO al no ser suficientes para oxidar al H₂O₂¹¹². Además, la GPx es un importante sistema de defensa no enzimático intracelular y extracelular contra el O₂⁻. Se ha reportado que en personas con SM hay inhibición en su actividad¹¹³. Por otro lado, los niveles de LPO se observaron aumentados en las ratas con SM lo que pudiera relacionarse con la disminución de la GPx, SOD, CAT ya que estas desempeñan un papel importante para la disminución de la LPO²⁵. Además, la GST también participa al reducir los niveles de LOOH y 4-HNE ocasionados por la LPO en procesos de EO⁴². Los resultados muestran que la actividad de la GST se encontró significativamente disminuida a diferencia de las ratas control. Perez-Torres *et al.*, (2019) reportó que la RI y la hiperinsulinemia pueden contribuir a la inhibición de la GST debido al EO generado y aumentar la LPO⁷⁶. Por su parte, la GR siendo la enzima que cataliza al glutation oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH) usando al NADPH como fuente energética, fue la única enzima que se encontró aumentada, esto puede estar asociado con la disminución del GSH presentado en las ratas con SM al estimular a la enzima como un mecanismo compensatorio

en su actividad y reducir los niveles de GSSH al intentar aumentar los niveles de GSH¹¹⁴. Por otra parte, el aumento en los niveles de carbonilación en las ratas del grupo de SM sugiere mal funcionamiento proteico resultado del daño oxidante ocasionado por la enfermedad, ya que se ha reportado que esto puede presentarse en caso de existir algún daño renal³⁶.

La administración de HSL al 2% en ratas con SM mostró que la concentración de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, metabolitos secundarios del ON, disminuyó significativamente a diferencia de las ratas con SM, lo cual sugiere que hay mayor producción del ON endotelial (eNOS), lo que provoca vasodilatación, mejoramiento en la función endotelial y del tono muscular en los vasos sanguíneos. Lim *et al.*, (2017) reportaron que los polifenoles presentes en la HSL activan la vía PI3K en el endotelio, siendo capaz de regular al ON mediante la fosforilación del eNOS y al suprimir la movilización del Ca^{2+} intracelular, aumentando la vasorrelajación endotelial¹¹⁵.

Se observó, además, el aumento en la actividad de la enzima antioxidante SOD_{Mn} , y la tendencia a aumentar de la enzima $\text{SOD}_{\text{Cu/Zn}}$, consideradas las primeras líneas de defensa contra las ERO al reducir los niveles de O_2^- así como de mejorar la función renal en ratas con SM²⁵. Pérez-Torres *et al.*, (2019) y Zuñiga-Muñoz *et al.*, (2013) reportaron que al presentar elevación de las isoformas de SOD por el tratamiento con HSL se mejora tanto la función cardíaca como la función hepática respectivamente, ya que evita la producción de ERO lo que aumenta la capacidad antioxidante y disminuyen los efectos adversos que provocan la expresión de los factores de transcripción Bax, tBib y pJNK que ayudan a disminuir la apoptosis inducida por ERO^{76,79}. Se ha reportado que el ácido protocatecuico presente en la HSL, posee gran actividad antioxidante al proteger a las células del daño citotóxico y genotóxico al atrapar a las ERO como al O_2^- y OH ya que funciona como donador de moléculas de hidrógeno haciendo más estable al O_2^- ⁵⁶. Sin embargo, al haber mayor actividad de las SOD, esto produce al aumento de H_2O_2 lo que puede conducir al incremento de las enzimas que lo detoxifican como la GPx.

Los resultados muestran que la actividad de esta enzima aumentó al administrar HSL a las ratas con SM. Se reporta (Whitin *et al.*, 2002) que la GPx es sintetizada y secretada predominantemente en los túbulos renales al funcionar como enzima antioxidante extracelular para ajustar la concentración de ERO y después de un daño oxidante en la circulación sanguínea y renal¹¹⁶. No obstante, la actividad de las peroxidasas se vio también incrementada en nuestro grupo experimental tratadas con HSL. Se reporta que las peroxidasas pueden reducir la producción de ERO por medio de una reacción similar a la CAT⁷⁹. Paramita *et al.*, 2020, han mencionado que los

polifenoles, las antocianinas la cianidina y la delphinidina de la HSL, son inductores para la formación y activación tanto de la SOD como de la GPx actuando como donadores de electrones y átomos de H⁺ así como de mejorar los niveles de GPx en el tejido renal¹¹⁷. Soto *et al.*, (2016) indicaron que las propiedades antioxidantes de la HSL, disminuyen el EO al aumentar la actividad de la GPx en pacientes con síndrome de Marfan¹¹⁸, también se ha reportado que la HSL aumenta la capacidad antioxidante contra la lesión por isquemia-reperfusión renal ocasionado por acetaminofen¹¹⁹ y en el daño hepático por toxicidad al tetracloruro de carbono¹²⁰.

Además, se ha descrito que el extracto de HSL puede incrementar la concentración de GSH que es el principal antioxidante celular ya que tiene la capacidad de atrapar moléculas de OH y de O₂⁻ así como de regenerar vitamina E y C en su forma activa⁷⁹, nuestros resultados muestran que las ratas con SM tratadas con HSL al 2%, mostraron aumento en los niveles de GSH de manera significativa comparadas con las ratas con SM en el homogeneizado de riñón. Soto *et al.*, (2016) menciona que el tratamiento con HSL en pacientes con síndrome de Marfan contribuye al aumento en la concentración de GSH, favoreciendo la disminución del EO¹¹⁸. Por su parte, Lin *et al.*, (2009) menciona que el aumento del GSH se debe a la presencia del ácido protocatecuico y a los polifenoles de la HSL y que este ácido actúa como potencial inhibidor de la expresión de la iNOS que es responsable de la sobreproducción de ON que es inductor del EO¹²¹.

Por su parte, Pérez-Torres *et al.*, (2019) reportaron que en el corazón de ratas con SM+HSL la concentración de GSH aumenta, junto con la tendencia a incrementar la actividad de la GR sugiriendo que la infusión de HSL puede contribuir al aumento de GSH a través de su regeneración ocasionado por la actividad de GR⁷⁶. A diferencia de nuestros resultados, la actividad de GR se observó disminuida en las ratas con SM+HSL esto puede ser por el aumento en la utilización de GSH por la HSL y como consecuencia la GR probablemente dejó de ser estimulada como un mecanismo compensatorio, actuando la HSL como un mecanismo coadyuvante al GSH para el control del EO¹¹⁴.

En el presente estudio las ratas tratadas con SM+HSL presentaron reducción en los niveles de LPO a diferencia del grupo de las ratas con SM, que en parte podría explicar el aumento de la GSH y la disminución de la LPO ya que se ha reportado (Soto *et al.*, 2006) que favorece el aumento del sistema antioxidante no enzimático en la que los productos de la LPO reaccionan fácilmente con el GSH para la desintoxicación¹¹⁸. Se ha indicado que la HSL posee una fuerte habilidad antioxidante para prevenir la oxidación de las LDL, ya que reduce los niveles de MDA debido a

los componentes polifenólicos y a los ácidos dihidrobenzóicos como el ácido protocatecúico⁵⁶. Los polifenoles participan como captadores de ERO en una segunda línea de defensa cuando no han sido neutralizados por el propio sistema antioxidante enzimático⁵⁶, pero particularmente en la inhibición de la LPO se ha relacionado con la cianidin-3-glucósido que reacciona con los radicales peróxidos y los convierte en ácido protocatecúico que funciona como un inductor para la producción de otro eliminador de radicales que podría reaccionar con los RL¹²². Mezni *et al.*, (2019) indicó que la HSL disminuye la concentración de MDA en ratas expuestas a Cipermetrina un potente pesticida inductor de ERO¹²³, Pérez-Torres *et al.*, (2019), indicaron que la HSL ayuda a disminuir los niveles de LPO en el corazón aislado actuando como protector en la función cardíaca en ratas con SM⁷⁶.

La actividad de la GST no mostró aumento significativo, presentó tendencia al incremento, esto se puede relacionar con la disminución de la LPO ya que la GST participa en la protección del daño causado por lípidos oxidados contribuyendo al aumento en su actividad. Se ha reportado en ratas knock-out a GST los niveles elevados de 4-HNE, se asocia a reducción de la capacidad antioxidante y apoptosis¹²⁴.

Nurkhasanah *et al.*, (2016) indican que el extracto de la flor de HSL tiene efecto hepatoprotector al aumentar la actividad de GST en ratas tratadas con dimetilbenz(a) antraceno, potente quimioterapéutico causante de daño hepático.¹²⁵ El efecto antioxidante de la GST se realiza a través de la conjugación enzimática con el GSH que reacciona con los metabolitos tóxicos y los convierte en compuestos más solubles que son capaces de eliminarse del organismo⁴¹.

Los niveles de carbonilación no mostraron diferencias significativas al administrar HSL, sin embargo, se observa tendencia a la disminución esto puede relacionarse por la presencia del resveratrol en la HSL, al activar la Sirt1, responsable de la regulación mediante la desacetilación de las proteínas que desempeñan un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades metabólicas, la regulación de los lípidos, homeostasis de la glucosa, control de la insulina, efectos antiinflamatorios, función endotelial y control en el daño oxidativo debido al incremento de la biogénesis mitocondrial⁵⁶. Finalmente, también se reporta que los pigmentos, como las catequinas y la epigallocatequina galato presentes en la HSL podían estar relacionados con su potente actividad antioxidante, esto se ha demostrado en varios estudios tanto *In vitro* como *In vivo*, al eliminar los RL y regenerar otros antioxidantes para prevenir los daños oxidativos celulares en diversas enfermedades¹¹⁸.

CONCLUSIÓN:

Basado en esos resultados del presente estudio se sugiere que el tratamiento con infusión de HSL al 2% protege la función renal en un modelo en rata con SM a través de los antioxidantes naturales como el ácido protocatecúico, antocianinas, cianidin-3-glucosido, quercetinas y los polifenoles; además de ayudar a la disminución del peso corporal, la presión sanguínea sistólica, los niveles de TAG, de insulina, del índice HOMA y de la leptina en sangre y favorecen la respuesta vascular en el riñón representado con el aumento de la tasa de filtración glomerular para la mejor depuración de la creatinina. Además de promover el aumento de la actividad enzimática antioxidante que conlleva a la disminución del EO favoreciendo la función renal deteriorada en el SM.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Kaur, J. A. Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* **2014** Volume 2019, Article ID 4301528, 1 page <https://doi.org/10.1155/2019/4301528>.
2. International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic síndrome, <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>.
3. Gómez-Miranda, J.E.; Elizondo-Argueta, S.; Rangel-Mejía, P.; Sánchez-Zúñiga, M.J. Guía práctica clínica de síndrome metabólico. *Asociación Latinoamericana de Diabetes*, **2019**.
4. Peña-Espinoza, B.I.; Granados-Silvestre, M.A.; Sánchez-Pozos, K.; Ortiz-López, M.G.; Menjivar, M. Síndrome Metabólico en niños mexicanos: poca efectividad de las definiciones diagnósticas. *Endocrinol Diabetes Nutri.* **2017** <http://dx.doi.org/10.1016/j.endinu.2017.04.004>
5. Villalobos-Sánchez, A.; Millán-García, G.; Narankievicz, D. Síndrome Metabólico. *Medicine.* **2017**, 42, 2485-2493.
6. Cameron, A.J.; Shaw, J.E.; Zimmet, P.Z. The metabolic síndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrin Metab Clin.* **2004**, 33, 351-375
7. Nashar, K.; Egan, B.M. Relationship between chronic kidney disease and metabolic syndrome: current perspectives. *Diabet, Metab syndr and Ob.* **2014**, 7, 421-435.
8. Locatelli, F.; Pozzoni, P.; Del Vecchio, L. Renal Manifestations in the Metabolic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* **2006**, 17, S81-S85.
9. Wisse, B.E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol.* **2004**, 15, 2792-2800.
10. Lee, J.E.; Choi, S.Y.; Huh, W.; Kim, Y.G.; Kim, D.J.; Oh, H.Y. Metabolic syndrome, C-reactive protein, and chronic kidney disease in non-diabetic, nonhypertensive adults. *Am J Hypertens.* **2007**, 20, 1189-1194.
11. Wolf, G.; Hamann, A.; Cheol-Han, D.; Welchem, U.; Theiss, F.; Ziyadeh, F.N.; Stahl, R.A.K. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **1999**, 56, 860-872.
12. Jiang, X.; Srinivasan, S.R.; Radhakrishnamurthy, B.; Dalferes, E.R.; Bao, W.; Berenson, G.S. Microalbuminuria in young adults related to blood pressure in a biracial (black-white) population. The Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens.* **1994**, 7, 794-800.
13. Cachofeiro, V.; Lahera V.A.F.; Tresguerres, J. Aspectos anatomofuncionales del riñón. Tresguerres JAF (Ed). *Fisiología Humana*. 2005, (pp 375). Madrid, España. McGraw-Hill Interamericana.
14. Gartner, L.P.; Hiatt, J.L. *Texto atlas de histología*. CDMX, México Mc Graw-Hill Interamericana **2002**.
15. Linz, D.; Hohl, M.; Elliot, A.D.; Lau, D.H.; Mahfoud, F.; Esler, M.D.; Sander, P.; Böhm, M. Modulation of renal sympathetic innervation: recent insights beyond blood pressure control. *Clin Auton Res.* **2018**, 28, 375-384.
16. Sata, Y.; Head, G.A.; Denton, K.; May, C.N.; Schlaich, M.P. Role of Sympathetic Nervous System and Its Modulation in Renal Hypertension. *Front.Med.* **2018**, 5, 82-92.
17. Toda, N.; Okamura, T. Modulation of Renal Blood Flow and Vascular Tone by Neuronal Nitric Oxide Synthase - Derived Nitric Oxide. *J Vasc Res.* **2011**, 48, 1-10.
18. Edwards, R.M. Response of isolated renal arterioles to acetylcholine, dopamine and bradykinin. *Am. J. Physiol.* **1985**, 248, F183-F189.

19. Wang, C.; Blough, E.R.; Arvapalli, R.; Dai, X.; Paturi, S.; Manne, N.; Addagarla, H.; Triest, W.E.; Olajide, O.; Wu, M. Metabolic syndrome-induced tubulointerstitial injury: Role of oxidative stress and preventive effects of acetaminophen. *Free Radical Bio Med.* **2013**, *65*, 1417-1426.
20. Zuo, L.; Zhou, T.; Panell, B.K.; Ziegler, A.C.; Best, T.M. Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.* **2015**, *214*, 329-348.
21. Lushchak, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem-Biol. Interact.* **2014**, *224*, 164-175.
22. Roberts, C.K.; Sindhu, K.K. Oxidative Stress and metabolic syndrome. *Life Sciences.* **2009**, *84*, 705-712.
23. Winterbourn, C. Biological chemistry of superoxide radical. *ChemTexts.* **2020**, *6*, <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0101-8>
24. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B.* **2007**, *39*, 44-84.
25. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First line antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alexandria J Med.* **2018**, *54*, 287-293.
26. Azadmanesh, J.; Borgstahl, G.E.O. A Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase. *Antioxidants.* **2018**, *25*, 3-16.
27. Bretón-Romero, R.; Lamas, S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 529-534.
28. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613-619.
29. Sepasi-Tehrani, H.; Moosavi-Movahedi, A.A. Cátale and its misteries. *Prog Biophys Mol Bil.* **2018**, *30*, 1-8.
30. Goyal, M.; Basak, A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell.* **2010**, *10*, 888-897.
31. Ghezzi, P. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res.* **2005**, *39*, 573-580.
32. Bajic, V.P.; VanNeste, C.; Obradovic, M.; Zafirovic, S.; Radak, D.; Bajic, V.B.; Essack, M.; Isenovic, E.R. Glutathione “Redox Homeostasis” and Its Relation to Cardiovascular Disease. *Oxi Med Cell Longev.* 2019, Article ID 5028181, 14 pages, **2019**. <https://doi.org/10.1155/2019/5028181>.
33. Ithayaraja, C.M. Mini-Review: Metabolic Functions and Molecular Structure of Glutathione Reductase. *Int J Pharm Sci Rev Res.* **2011**, *9*, 104-115.
34. Lipinski, B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxi Med Cell Longev.* **2011**, Article ID 809696, 9 pages, 2011, <http://doi:10.1155/2011/809696>.
35. Treml, J.; Smejkal, K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radical. *Compr Rev Food Sci F.* **2016**, *15*, 720-738.
36. Dalle-Donne, I.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein carbonylation in Human Diseases. *Trends Mol Med.* **2003**, *9*, 169-176.
37. Vaca, C.E.; Wilhelm, J.; Harms-Ringdahl, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Rech.* **1988**, *195*, 137-149.

38. Hauck, A.K.; Bernlohr, D.A. Oxidative Stress and lipotoxicity. *J Lipid Res.* **2016**, *57*, 1976 - 1986.
39. Kota V.R.; Srivastava, S.; Singhal, S.S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. *Oxi Med Cell Longev.* **2013**, Article ID 583438, 3 pages, 2013, <http://doi.org/10.1155/2017/2163285>.
40. Raza, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS Lett.* **2011**, *278*, 4243-4251.
41. Sharma, M.; Gupta, S.; Singh, K.; Mehndiratta, M.; Gautam, A.; Kalra, O.P.; Shukla, R.; Gambhir, J.K. Association of glutathione-S-transferases with patients of type 2 diabetes mellitus with and without nephropathy. *Diabetes Metab Syndr.* **2016**, *10*, 194-197.
42. Singhal, S.S.; Singh, S.P.; Singhal, P.; Horne, D.; Singhal, J.; Awasthi, S. Antioxidant Role of Glutathione S-Transferases: 4-Hydroxynonenal, a Key Molecule in Stress -Mediated Signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2015**, *289*, 361-370.
43. Ellulu, M.S. Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: a review of facts and underlying mechanisms. *Inflammopharmacol.* **2017**, *25*, 313-328.
44. Santos-Sánchez, N.F.; Salas-Coronado, R.; Villanueva-Cañongo, C.; Hernández-Carlos, B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants.* **2019**, Intechopen.85270, <http://10.5772/intechopen.85270>.
45. Ratliff, B.B.; Abdulmahdi, W.; Pawar, R.; Wolin, M.S. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Radox Sign.* **2016**, *25*, 119-151.
46. Krata, N.; Zagodzón, R.; Foronczewicz, B.; Mucha, K. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause of the Consequence? *Arch Immunol Ther Ex.* **2018**, *66*, 211-220.
47. Chen, Y.; Tang, Z.; Yang, G. Malignant hypertension in patients with idiopathic IgA nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* **2005**, *28*, 251-258.
48. Yang, J.J.; Jennette, J.C.; Falk, R.J. Immune complex glomerulonephritis is induced in rats immunized with heterologous myeloperoxidase. *Clin Exp Immunol.* **1994**, *97*, 466-473.
49. Nashar, K.; Egan, B.M. Relationship between chronic kidney disease and metabolic syndrome: current perspectives. *Diabetes, Metab Syndr Obes.* **2014**, *7*; 421-435.
50. Locatelli, F.; Pozzoni, P.; Del Vecchio, L. Renal Manifestations in the Metabolic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* **2006**, *17*, S81-S85.
51. Moreno-Manzano, V.; Ishikawa, Y.; Lucio-Cazanas, J.; Kitamura, M. Selective Involvement of Superoxide Anion, but Not Downstream Compounds Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite, in Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis of Rat Mesangial Cells. *J Biol Chem.* **2000**, *275*, 12684-12691.
52. Ozbek, E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *Int J Nephrol.* **2012**, Article ID 465897, 9 pages, 2012, <http://doi:10.1155/2012/465897>.
53. Chade, A.R.; Rodriguez-Porcel, M.; Herrmann, J.; Krier, J.D.; Zhu, X.; Lerman, A.; Lerman, L.O. "Beneficial effects of antioxidant vitamins on the stenotic kidney," *Hypertension.* **2003**, *42*, 605-612.
54. Ramesh-Prasad, G.V. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: current status and future directions. *World J Nephrol.* **2014**, *3*, 210-219.
55. Taddei, S.; Virdis, A.; Ghiadoni, I.; Magagna, A.; Salvetti, A. Vitamin C improves endothelium dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* **1998**, *97*, 2222-2229.

56. Pérez-Torres, I.; Ruíz-Ramírez, A.; Baños, G.; El-Hafifi, M. Hibiscus Sabdariffa Linnaeus (Malvaceae), curcumin and Resveratrol as Alternative Medicinal Agents Against Metabolic Syndrome. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* **2013**, 11, 25-37.
57. Wang, S.C.; Lee, S.F.; Wang, C.J.; Lee, C.H.; Lee, W.C.; Lee, H.J. Aqueous Extract from Hibiscus Sabdariffa Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulation Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 γ in an Experimental Animal Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2011**, Article 938126, 9 pages, 2011. <http://doi.org/10.1093/ecam/nep181>.
58. Rubio-Ruiz, M.E.; Guarner-Lans, V.; Cano-Martínez, A.; Díaz-Díaz, E.; Manzano-Pech, L.; Gamas-Magaña, A.; Castrejón-Tellez, V.; Tapia-Cortina, C.; Pérez-Torres, I. Resveratrol and quercetin administration improves antioxidant DEFENSES and reduces fatty liver in metabolic syndrome rats. *Molecules* **2019**, 24, 1297.
59. Lin, C.Y.; Huang, C.S.; Huang, C.Y.; Yin, M.C. Anticoagulatory, antiinflammatory and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J Agric Food Chem.* **2009**, 57, 6661-6667.
60. Carvajal, Z.O.; Waliszewski, S.M.; Barradas, D.M.; Orta-Flores, Z.; Hayward, P.M.; Nolasco, H.C.; Angulo, G.O.; Sanchez, R.R. The consumption of Hibiscus sabdariffa dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. *Plant Foods Hum Nutr.* **2005**, 60, 153-159.
61. Hase, M.; Babazono, T.; Karibe, S.; Kinae, N.; Iwamoto, Y. Renoprotective effects of tea catechin in streptozotocin induced diabetic rats. *Int Urol Nephrol.* **2006**, 38, 693-699.
62. Yamabe, N.; Yokozawa, Y.; Oya, T.; Kim, M. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, 319, 228-236.
63. Wen-Chin, L.; Chau-Jong, W.; Yu-Hsin, C.; Jen-Dong, H.; Su-Ya, C.; Hong-Chen, C.; Huei-Jane, L. Polyphenols Extracts from Hibiscus sabdariffa Linnaeus Attenuate Nephropathy in experimental type 1 diabetes. *J Agric Food Chem.* **2009**, 57, 2206-2210.
64. Kunworarath, N.; Muangnil, P.; Itharat, A.; Hiranyachattada, S. Acute and Subchronic Treatment of Hibiscus sabdariffa Linn. Extract on Renal Function and Lipid Peroxidation in Cisplatin-Induced Acute Renal Failure Rats. *J Physiol Biomed Sci.* **2014**, 27, 5-12.
65. Chou, S.T.; Lo, H.Y.; Li, C.C.; Cheng, L.C.; Chou, P.C.; Lee, Y.C.; Ho, T.Y.; Hsiang, C.Y. Exploring the effects and mechanism of Hibiscus sabdariffa on urinary tract infection and experimental renal inflammation. *J Ethnopharmacol.* **2016**, 194, 617-625.
66. H-Ali, B.; Cahliková, L.; Opletal, L.; Karaka, T.; Manoj, P.; Ramkumar, A.; Al Suleimani, Y.M.; Al Za'abi, M.; Nemmar, A.; Chocholousova-Havlikova, L.; Locarek, M.; Siatka, T.; Blunden, G. Effect of aqueous extract and anthocyanins of calyces of Hibiscus sabdariffa (Malvaceae) in rats with adenine induce chronic kidney diseases. *J Pharm Pharmacol.* **2017**, 69, 1219-1229.
67. Hwang, I.S.; Ho, H.; Hoffman, B.B.; Reaven, G.M. Fructose induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* **1987**, 10, 512-516.
68. Reaven, G.M.; Ho, H. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens.* **1991**, 4, 610-614.
69. Pérez-Torres, I.; Roque, P.; El Hafidi, M.; Díaz-Díaz, E.; Baños, G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res.* **2009**, 43, 761-771.

70. Baños, G.; Carvajal, K.; Cardoso, G. Vascular reactivity and effect of serum in rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens.* **1997**, *10*, 379-388.
71. Lopez, Y.R.; Pérez-Torres, I.; Zuñiga-Muñoz, A.; Guarner, V.L.; Díaz-Díaz, E.; Soria, E.C.; Velazquez, R.E. Effect of Glycine on Adipocyte Hypertrophy in a Metabolic Syndrome Rat Model. *Curr Drug Deliv.* **2016**, *13*, 158-169.
72. Pérez-Torres, I.; Torres-Narváez, J.C.; Guarner, V.; Díaz-Díaz, E.; Pérezpeña-Díazconti, M.; Romero, A.; Manzano, L. Myocardial protection from ischemia-reperfusion damage by the antioxidant effect of Hibiscus Sabdariffa Linnaeus in metabolic syndrome rats (IN PRESS). *Oxid Med Cell Longev.* **2019**, Article ID 1724194, 13 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1724194>.
73. BenGershom, E. Screening for albuminuria: A case for estimation of albumin in urine. *Clin Chem.* **1975**, *21*, 1795-1798.
74. Vazquez-Cruz, B.; López, P.; Talamás-Rohana, P.; Escalante, B. Increased renal vasoconstriction and gene expression of cyclooxygenase -1 in renovascular hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2000**, *36*, 577-583.
75. Tublin, M.; Tessier, F.; Murphy, M. Correlation between renal vascular resistance, pulse pressure, and the resistive index in isolated perfused rabbit kidneys. *Radiology* **1999**, *23*:258-264.
76. Gutteridge, J. The use of standards for malonyldialdehyde. *Analytical Biochemistry.* **1945**, *69*, 518-526.
77. Pérez-Torres, I; Roque, P.; El Hafidi, M.; Díaz-Díaz, E.; Baños, G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat modelo of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res.* **2009**, *43*, 761-771.
78. Zuñiga-Muñoz, A.M.; Guarner, V.; Díaz-Cruz, A.; Diaz-Díaz, E.; Nava-Cuellar, C.; Beltrán-Rodríguez, U.; Pérez-Torres, I. Modulation of Oxidative Stress in Fatty Liver of Rat with Metabolic Syndrome by *Hibiscus Sabdariffa*. *Immun Endoc Agents in Med Chem.* **2013**, *13*, 1-10.
79. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1979**, *227*, 680-685.
80. Abrams, J.; Webster, D. Purification, partial characterization and posible role of catalase in the bacterium *Vitreoscilia*. *Arch Biochem Biophys.* **1990**, *279*: 54-59.
81. Chen, C.; Pan, S. Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. *Bot Bull Acad Sinica.* **1996**, *37*, 107-111.
82. Flohé, L.; Gunzler, W. Assay of glutathione peroxidase. *Method Enzymol.* **1984**, *105*, 114-121.
83. Pérez-Torres, I.; Castrejón-Téllez, V.; Soto, M.E.; Rubio-Ruiz, M.E.; Manzano-Pech, L.; Guarner-Lans, V. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1786.
84. Ojulari, O.V.; Gi-Lee, S.; Nam, J.O. Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from Hibiscus Sabdariffa L on Obesity. *Molecules.* **2019**, *24*, 210.
85. Deng, Y.T.; Chang, T.W.; Lee, M.S.; Lin, J.K. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in c2c12 mouse skeletal muscle cells. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1059-1066
86. Shao, W.; Yu, Z.; Chiang, Y.; Yang, Y.; Chai, T.; Foltz, W.; Lu, H.; Fantus, I.G.; Jin, T. Curcumin Prevents High Fat Diet Induced Insulin Resistance and Obesity *via* Attenuating

- Lipogenesis in Liver and Inflammatory Pathway in Adipocytes. *PLoS One*. **2012**, *7*, e28784.
87. Sasaki, R.; Nishimura, N.; Hoshino, H.; Isa, Y.; Kadowaki, M.; Ichi, T.; Tanaka, A.; Nishiumi, S.; Fukuda, I.; Ashida, H.; Horio, F.; Tsuda, T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1619-1627.
 88. Ghadge, A.A.; Khaire, A.A. Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine*. 2019, Article 154735, **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154735>
 89. Diez-Echave, P.; Vezza, T.; Rodríguez-Nogales, A.; Ruiz-Malagon, A.J.; Hidalgo-García, L.; Garrido-Mesa, J.; Molina-Tijeras, J.A.; Romero, M.; Robles-Vera, I.; Pimentel-Moral, S.; Borrás-Linares, I.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Micol, V.; García, F.; Duarte, J.; Rodríguez-Cabezas, M.E.; Gálvez, J. The prebiotic properties of hibiscus sabdariffa extract contribute to the beneficial effects in diet-induced obesity in mice, *Int Food Res J*, **2020**, 127,1.
 90. Joven, J.; March, I.; Espinel, E.; Fernández-Arroyo, S.; Rodríguez-Gallego, E.; Aragonés, G.; Beltrán-Debon, R.; Alonso-Villaverde, C.; Rios, L.; Martín-Paredero, V.; Menendez J.A.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Camps, J. “Hibiscus sabdariffa extract lowers blood pressure and improves endothelial function”. *Mol Nutr Food Res*. **2014**, *58*, 6, 1374-1378.
 91. Von-Dentz, K.E.; Silva, B.S.; Queiroz, E.A.I.F.; Bomfim, G.F.; Nascimento, A.F.; Sugizaki, M.M.; Luvizotto, R.A.M. Hibiscus Sabdariffa Etnanolic extract modulates adipokine levels, decreases visceral fat and improves glycemic profile in high/sugar diet-induced obese rats. *Food Sci Nutr*. **2020**, *51*, 222-233.
 92. Riaz, G.; Chopra, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomed Pharmacother*. **2018**, *102*, 575-586.
 93. Khattab, H.A.H.; El-Shitany, N.; Al-lily, A.K.S. Hibiscus sabdariffa extract alleviate nephrotoxicity induced by adriamycin in male rats. *Biosci Rec*. **2016**, *13*, 32-42.
 94. Yi-Sun, Y.; Chau-Jong, W.; Chien-Ning, H.; Mu-Lin, C.; Ming-Jinn, C.; Chiung-Huei, P. Polyphenols of Hibiscus sabdariffa improved diabetic nephropathy via attenuating renal epithelial mesenchymal transition. *J. Agric. Food Chem*. **2013**, *61*, 7545–7551.
 95. Nwachukwu, D.C.; Aneke, E.I.; Nwachukwu, N.Z.; Azubike, N.; Obika, L.F. Does consumption of an aqueous extract of Hibiscus sabdariffa affect renal function in subjects with mild to moderate hypertension? *J. Physiol. Sci*. **2016**, *67*, 227-234.
 96. Melchert, A.; Canuto-Rosa, A.; Genari, V.; Salvador-Gonzalez-Frontana, M.; Prandini de la Costa Reis, R.; Guimaraes-Okamoto, P.T.C.; Amaro, J.L.; Canavese-Rahal, S. Effect of Hibiscus sabdariffa supplementation on renal function and lipid profile in obese rats. *Asian J Anim Vet Adv*. **2016**, *11*, 693-700.
 97. Yang, Y.S.; Huang, C.N.; Wang, C.J.; Lee, Y.J.; Chen, M.L.; Peng, C.H. Polyphenols of Hibiscus sabdariffa improved diabetic nephropathy via regulating the pathogenic markers and kidney functions of type 2 diabetic rats. *J. Funct. Foods*. **2013**, *5*, 810-819.
 98. Trujillo, J.; Chirino-Irasema, Y.; Martínez-Tagueña, N.; Pedraza-Chaverri, J. Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders Implicated. *Eur J Pharmacol*. **2018**, *818*, 554-568.
 99. Imig, J.D.; Cook, K.A.; Inscho, W.E. Postglomerular vasoconstriction to angiotensin II and norepinephrine depends on intracellular calcium release. *Gen Pharmacol*. **2000**, *34*, 409-415.

100. Correia, A.G.; Madden, A.C.; Bergtröm, G.; Evan, R.G. Effects of Renal Medullary and Intravenous Norepinephrine on Renal Antihypertensive Function. *Hypertension*. **2000**, *35*, 965-970.
101. Rahma, H.H.A.; Haredy, H.H.; Abd-Elhady, H.K.; Abdelsalam, A.F. Pharmacological Study of the Effect of Cold and Hot Aqueous Extracts of Hibiscus sabdariffa on Vascular Activity of Diabetic Albino Rats. *JAMPS*. **2018**, *16*, 1-9.
102. Dow, C.A.; Lincenberg, G.M.; Greiner, J.J.; Stauffer, B.L.; DeSouza, C.A. Endothelial vasodilator function in normal-weight adults with metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab*. **2016**, *41*, 1013-1017.
103. Gholamnezhad, Z.; Ghorani, V.; Saadt, S.; Shakeri, F.; Hossein, M.H. Te effects of medicinal plants on muscarinic receptors in various types of smooth muscle. *Phytother Res*. **2018**, *32*, 2340-2363.
104. Liu, H.; Liang, Z.M.; Li, R.; Yu, Y.G. Advances in the mechanisms of Hibiscus sabdariffa L on hypertension. **2020**, E3S Web Conf. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014501039>.
105. Suvorava, T.; Lauer, N.; Kumpf, S.; Jacob, R.; Meyer, W.; Kojda, G. Endogenous Vascular Hydrogen Peroxide Regulates Arteriolar Tension In Vivo. *Circulation*. **2005**, *112*, 16, 2487-2495.
106. Hatoum, O.A.; Binion, D.G.; Miura, H.; Telford, G.; Otterson, M.F.; Gutterman, D.D. Role of hydrogen peroxide in ACh-induced dilation of human submucosal intestinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2005**, *288*, H48–H54.
107. Cseko, C.; Bagi, Z.; Koller, A. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. *J Appl Physiol*. **2004**, *97*, 1130–1137.
108. Park, S.W.; Noh, H.J.; Sung, D.J.; Kim, J.G.; Kim, J.M.; Ryu, S.Y.; Kang, K.J.; Kim, B.; Bae, Y.M.; Cho, H. Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive Kv currents through S-glutathionylation. *Eur J Physiol* **2015**, *467*, 285-297.
109. Ajay, M.; Chai, H.J.; Mustafa, A.M.; Gilani, A.H.; Mustafa, M.R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of Hibiscus sabdariffa L. calyces. *J Ethnopharmacol*. **2007**, *109*, 388–393.
110. Liu, Y.; Lu, C.M.; Li, P.; Ma, C.; He, S.; Zeng, J.; Ping, F.; Zhang, H.; Li, W.; Xu, L.; Li, Y. Relationship between Decreased Serum Superoxide Dismutase Activity and Metabolic Syndrome Mediating Role of Insulin Resistance and B-Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. **2020**, Article ID 5384909, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2020/5384909>.
111. Baños, G.; Medina-Ocampo, O.M.; Maldonado, P.D.; Zamora, J.; Pérez, I.; Pavón, N.; Pedraza-Chaverri, J. Activities of antioxidant enzymes in two stages of pathology development in sucrose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol*. **2005**, *83*, 278-286.
112. Samsam-Shariat, S.Z.; Bolhasani, M.; Sarrafzadegan, N.; Najafi, S.; Asgary, S. Relationship between blood peroxidases activity and visfatin levels in metabolic syndrome patients. *ARYA. Atheroscler* **2014**, *10*, 218-26.
113. Samsam-Shariat, S.Z.; Asgary, S.; Salehizadeh, L.; Sakhaei, F. Enzymatic antioxidant system and endothelial function in patients with metabolic syndrome. *ARYA. Atheroscler*. **2020**, *16*, 94-101.

114. Vávrová, L.; Kodydková, J.; Zeman, M.; Dusejovska, M.; Macasek, J.; Stankova, B.; Tvrzicka, E.; Zak, A. Altered Activities of Antioxidant Enzymes in Patients with Metabolic Syndrome. *Obes facts* **2013**, *6*, 39-47.
115. Lim, Y.C.; Budin, S.B., Othman, F.; Latip, J.; Zainalabidin, S. Roselle polyphenols exert potent negative inotropic effects via modulation of intracellular calcium regulatory channels in isolated rat heart. *Cardiovas Toxicol.* **2016**, *17*, 251–259, 2017.
116. Whittin, J.C.; Bhamre, S.; Tham, D.M.; Cohen, H.J. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiology - Renal Physiol.* **2002**, *283*, F20–F28, 2002.
117. Paramita, N.; Fatayati, I.; Dewi, S.; Soeria, S.D.I.; Andraini, T.; Kartinah, N.T.; Ilyas, E.I.I.; Qibtiyah, M.; Yunita, S. Effect of Hibiscus sabdariffa Linn. on oxidative stress in cardiac tissue of overtrained rat: Study on malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) glutathione (GSH) and NADPH oxidase (Nox 2). **2020**, AIP Conference Proceeding. <https://doi.org/10.1063/5.0006534>.
118. Soto, M.E.; Zuñiga-Muñoz, A.; Guarner-Lans, V.; Duran-Hernández, E.J.; Pérez-Torres, I. Infusion of *Hibiscus sabdariffa* L. Modulates oxidative stress in patients with marfan syndrome. *Mediators. Inflamm.* **2016**, *2016*, 8625203.
119. Mirochnitchenko, O.; Weisbrot-Lefkowitz, M.; Reuhl, K.; Chen, L.; Yang, C.; Inouye, M. Acetaminophen toxicity: opposite effects of two forms of glutathione peroxidase, *The J Biol Chem.* **1999**, *274*, 10349–10355.
120. Yin, G.; Cao, L.; Xu, P.; Jeney G.; Nakao, M. Hepatoprotective and antioxidant effects of Hibiscus sabdariffa extract against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **2011**, *47*, 10-15.
121. Lin, C.Y.; Huang, C.S.; Huang, C.Y.; Yin, M.C. Anticoagulatory, antiinflammatory, and antioxidative effects of protocatechuic acid in diabetic mice. *J Agric Food Chem.* **2009**, *57*, 6661-6667.
122. Hirunpanich, V.; Utaipat, A.; Morales N.P.; Bunyaphatsara, N., Sato, H.; Herunsalee, A.; Suthisisang, C. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of hibiscus sabdariffa Linn. (roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol Pharm Bull.* **2005**, *28*, 481- 484.
123. Mezni, A.; Mhadhbi, L.; Khazri, A.; Sellami, B.; Dellali, M.; Mahmoudi, E.; Beyrem, H. The protective effect of Hibiscus Sadariffa calyxes extract against cypermethrin induced oxidative stress in mice. *Pestic Biochem Physiol.* **2019**, *16*. <http://doi: 10.1016/j.pestbp.2019.09.007>.
124. Engle, M.R.; Singh, S.P.; Czerniketal P.J. Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydro- xynonenal: generation and analysis of *mGsta4* null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2004**, *194*, 296– 308.
125. Nurkhasanah; Nurani, L.H.; Hakim, Z.R. Effect of rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) extract on glutathione S-transferase activity in rats. *Trop J Pharm Res.* **2016**, *10*, 2411-2416.