



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**MODULACIÓN DE LA REACTIVIDAD VASCULAR POR ESTRÉS REDUCTOR  
ASOCIADO AL CONSUMO EXCESIVO DE *Hibiscus sabdariffa Linnaeus*  
(malvaceae)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA**

**LINALOE GUADALUPE MANZANO PECH**

**TUTOR PRINCIPAL**

**ISRAEL PÉREZ TORRES, INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**MARIO PÉREZ MARTÍNEZ, FMVZ-UNAM**

**ROBERTO DÍAZ TORRES, FESC-UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO**

**DICIEMBRE 2022**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, a mis padres y hermanos por estar conmigo siempre, por darme su amor y paciencia en los momentos más difíciles.

A la UNAM y al Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser mi hogar todos estos años de estudio.

A la Veterinaria Meztli y al Médico Veterinario Adrián Moreno por todo el apoyo que me brindaron para poder realizar mis estudios de posgrado y por siempre confiar en mí.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por brindarme las instalaciones para poder realizar este proyecto.

A la beca CONACyT 726778, por el financiamiento otorgado para la realización de una parte de esta investigación.

Al Doctor Israel Pérez Torres, quién me permitió soñar en grande y desarrollarme profesionalmente, su esperanza y paciencia en mí me han permitido llegar hasta este momento. Hace 7 años tuve la fortuna de conocerlo y desde entonces el aprendizaje, el apoyo, y las risas son una constante, ojalá todos tuviéramos la oportunidad de tener a un tutor como usted, que nos enseñe a trabajar y salir adelante a pesar de las adversidades.

A la Dra. María Elena Soto, por sus palabras de inspiración y por darme su voto de confianza, siempre tendré presente sus enseñanzas “ser leal y honesto”. Es una mujer admirable que me ha enseñado a mantener mis ideales de manera diplomática.

A la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón, por ser mi guía desde que empecé a trabajar en el Departamento de Farmacología y seguir cada uno de mis pasos, ojalá la vida nos permita compartir muchos más momentos juntas.



Al Doctor Mario Pérez Martínez y al Doctor Roberto Díaz Torres por ser parte de mi comité tutor, cada semestre enriquecieron mi proyecto con sus conocimientos y observaciones.

Al Doctor José Juan Martínez Maya, a la Dra. Inda Marcela y a la M en C Nidia Gualo, por formar parte de este camino.

A mi amiga Claudia Karyna Alarcón por regalarme parte de tu tiempo para estudiar para mi examen de candidatura y siempre darme palabras de aliento para seguir adelante. También agradezco a la vida por ponerte en mi camino desde que estábamos en el Departamento de Farmacología, siempre me has compartido tus conocimientos (como toda una mamá gallina), eres parte del motivo por el cual quise estudiar un Doctorado y superarme académicamente.

A la familia de mi gran amiga, a Esther, a Lili y al pequeño Appa. Gracias por regresar a mi vida en el momento en el que más lo necesitaba, por escucharme y no juzgarme, por lograr momentos que no pueden ser capturados por una cámara. Gracias por ser ese apoyo que necesitaba para seguir adelante durante la pandemia, sin ustedes esto hubiera sido más difícil de lograr.

A David Meneses San Juan, sin duda eres una de las personas más optimistas que conozco, gracias por apoyarme en los momentos más difíciles de mi Doctorado, por escucharme y por prestarme tu hombro siempre que sentía que no iba a poder, eres una de las razones por las que este proyecto llegó a su conclusión.

## DEDICATORIA

A mi padre, el Dr. Fernando Cesar Manzano hace algunos años te uniste a la fuerza. Sin embargo, a pesar del tiempo todo esto ha sido gracias a ti. A tu disciplina, a tus enseñanzas y a tu amor, ojalá que donde estés puedas sentirte orgulloso de mi, gracias por inspirarme a ser la persona que soy y por haberme dicho que puedo lograr más.

A mi mamá María Guadalupe Pech Ek por ser mi compañera, por toda la paciencia y apoyo que siempre me has tenido, por darme valor para salir adelante y por escucharme cuando sentía que no iba a poder.

A mis hermanos Isai, Ibrahim y Vale, a pesar de todo siempre están ahí para brindarme sus consejos y apoyo, los quiero mucho.

A mi Fido por todo tu apoyo durante el Doctorado, siempre desvelándote conmigo para terminar todos los proyectos, sin duda eres el mejor chihuahueño cabeza de T-Rex que puede existir.

A mis compañeros de vida Thazmania, Wera, Pelusa, Cera, Jotkeys, Vader, Ramírez, Boxer y Pelos, ustedes hacen que mi vida sea más amena y que valga la pena seguir viviéndola.

A changoC por estar ahí y simplemente por hacerme feliz. Hay cosas que no se pueden expresar con palabras.

A Adrián Moreno por escucharme y darme tu apoyo a pesar de las diferencias.

A Esther y David, por hacerme reír en momentos difíciles y por ayudarme a ver hacia adelante, a pesar de que yo creía que iba a ser imposible.

“This is the way”



## Resumen

El estrés reductor (ER) es un concepto que actualmente no está bien definido. Sin embargo, se caracteriza por un incremento de los equivalentes reductores y de algunos componentes del sistema antioxidante, este aumento sostenido puede perturbar el equilibrio redox y generar efectos nocivos como interferir en la función, señalización y síntesis de ROS. Por otra parte, la *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* (HSL) también conocida como flor de Jamaica, es considerada un alimento funcional, atribuido a sus propiedades antioxidantes *per se* y por proveer algunos compuestos que favorecen el funcionamiento de los sistemas antioxidantes. En este sentido, algunos estudios han mostrado que, el exceso de antioxidantes podría conducir a ER, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la modulación de la reactividad vascular por ER asociada al consumo excesivo en diferentes concentraciones de infusión de HSL. Se utilizaron 40 ratas Wistar macho de  $300 \pm 50$  g, divididas en 4 grupos experimentales con 10 individuos cada uno, grupo 1 agua, grupo 2, 3 y 4 con infusión al 1.5, 3 y 6% de HSL respectivamente. Se retiró la aorta torácica y se dividió en tres secciones, en la primera parte se analizó la reactividad vascular, en la segunda sección se realizaron cortes histológicos para determinar cambios morfológicos de acuerdo a las diferentes porcentajes de HSL y con la tercera sección se determinaron diferentes componentes de los sistemas antioxidantes como la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), el glutatión (GSH), el selenio (Se), la tiorredoxina reductasa (TrxR), los nitritos y nitratos ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ), la 3-nitrotirosina (3-NT), los tioles, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión S transferasa (GST) y la lipoperoxidación (LPO). Los resultados mostraron que el grosor de la pared y las fibras elásticas en la aorta presentaron incremento significativo en el grupo de 6% de HSL con respecto al grupo control ( $p=0.004$  y  $p=0.02$  respectivamente). La presión arterial sistólica (PAS) aumentó de forma significativa en los grupos de HSL al 3% ( $p=0.02$ ) y 6% ( $p=0.01$ ) con respecto al control. Estos resultados repercutieron sobre mayor respuesta a la vasoconstricción ( $p=0.001$ ) y menor vasodilatación ( $p<0.01$ ) en los diferentes grupos experimentales. La alteración en la reactividad vascular se regularizó al incubar la aorta con algunos



ROS, como  $K_2O$  y  $H_2O_2$ . Además, la HSL favoreció el incremento significativo en los grupos de HSL al 6% de la G6PD ( $p=0.02$ ), el GSH ( $p=0.01$ ), Se ( $p=0.05$ ), la GPx ( $p=0.03$ ) y TrxR ( $p=0.01$ ), pero disminuyó los tioles ( $p<0.001$ ), la 3-NT ( $p=0.04$ ) y la actividad de la GST ( $p=0.0005$ ) lo que favoreció la LPO ( $p=0.01$ ). Los resultados obtenidos indican que el exceso de antioxidantes proporcionados por las infusiones al 3% y 6% de HSL modifican la respuesta de vasodilatación, vasoconstricción, aumentan la actividad del sistema antioxidante enzimático y por consiguiente agotan los ROS, lo cual conduce a ER, que se ve reflejado en el incremento de la presión arterial y en las alteraciones anatómicas en la pared de la aorta.

**Palabras clave:** Estrés reductor, *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus, sistema antioxidante, reactividad vascular, presión arterial sistólica.



## Abstract

Reductive stress (RS) is a concept that is currently not well defined. However, it is characterized by an increase in reducing equivalents and some components of the antioxidant system, this sustained increase can disturb the redox balance and generate harmful effects such as interfering with the function, signaling and synthesis of ROS. On the other hand, *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* (HSL) also known as hibiscus flower, is considered a functional food, attributed to its antioxidant properties *per se* and for providing some compounds that favor the functioning of antioxidant systems. In this sense, some studies have shown that, the excess of antioxidants could lead to ER, therefore, the aim of this study was to evaluate the modulation of vascular reactivity by ER associated with excessive consumption at different concentrations of HSL infusion. Forty  $300 \pm 50$  g male Wistar rats were used, divided into 4 experimental groups with 10 individuals each, group 1 water, group 2, 3 and 4 infused with 1.5, 3 and 6% HSL respectively. The thoracic aorta was removed and divided into three sections, in the first part the vascular reactivity was analyzed, in the second section histological sections were performed to determine morphological changes according to the different percentages of HSL and with the third section different components of the antioxidant systems such as glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) were determined, glutathione (GSH), selenium (Se), thioredoxin reductase (TrxR), nitrites and nitrates ( $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$ ), 3-nitrotyrosine (3-NT), thiols, glutathione peroxidase (GPx), glutathione S transferase (GST) and lipoperoxidation (LPO) were determined. The results showed that wall thickness and elastic fibers in the aorta presented significant increase in the 6% HSL group with respect to the control group ( $p=0.004$  and  $p=0.02$  respectively). Systolic blood pressure (SBP) increased significantly in the 3% ( $p=0.02$ ) and 6% ( $p=0.01$ ) HSL groups with respect to the control. These results had an impact on greater vasoconstriction response ( $p=0.001$ ) and lower vasodilatation ( $p<0.01$ ) in the different experimental groups. The alteration in vascular reactivity was regularized by incubating the aorta with some ROS, such as  $\text{K}_2\text{O}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Moreover, HSL





favored the significant increase in HSL groups at 6% of G6PD ( $p=0.02$ ), GSH ( $p=0.01$ ), Se ( $p=0.05$ ), GPx ( $p=0.03$ ) and TrxR ( $p=0.01$ ), but decreased thiols ( $p<0.001$ ), 3-NT ( $p=0.04$ ) and GST activity ( $p=0.0005$ ) which favored LPO ( $p=0.01$ ). The results obtained indicate that the excess of antioxidants provided by 3% and 6% HSL infusions modify the response of vasodilatation, vasoconstriction, increase the activity of the enzymatic antioxidant system and consequently deplete ROS, leading to ER, which is reflected in increased blood pressure and anatomical alterations in the aortic wall.

**Key words:** Reductive stress, *Hibiscus sabdariffa Linnaeus*, antioxidant system, vascular reactivity, systolic blood pressure.



## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Cloruro de aluminio
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante (siglas en inglés)
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>BK</b>	Bradiquinina
<b>CaCl</b>	Cloruro de Calcio
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CC</b>	Condición corporal
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4 dinitrobenceno
<b>CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>COOH</b>	Ácido nonadecanoico
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>cGMP</b>	Guanosina 3',5-monofosfato cíclico
<b>CMP</b>	Rendimiento mecánico cardíaco (siglas en inglés)
<b>CSF</b>	Factor estimulante de colonias (siglas en inglés)
<b>CVR</b>	Resistencia vascular coronaria (siglas en inglés)
<b>DTNB</b>	5,5'Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico
<b>EDCF</b>	Factor de contracción dependiente del endotelio (siglas en inglés)
<b>EDHF</b>	Factor de hiperpolarización derivado del endotelio (siglas en inglés)
<b>EDRF</b>	Factor relajante dependiente del endotelio (siglas en inglés)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminatetraacético
<b>EM</b>	Error máximo
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial (siglas en inglés)
<b>EO</b>	Estrés oxidante
<b>ER</b>	Estrés reductor
<b>EN</b>	Estrés nitrosiativo
<b>Fe</b>	Hierro
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GST</b>	Glutación S transferasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>Grd</b>	Glutarredoxina
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>G6P</b>	Glucosa 6 fosfato
<b>G6PD</b>	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido nítrico
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno



<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HSL</b>	<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linnaeus
<b>H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub></b>	Ácido fosfomolibdico
<b>H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub></b>	Ácido fosfotúngstico
<b>IDD</b>	Yodotironina desiodinasas
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible (siglas en inglés)
<b>JM</b>	Plata metenamina Jones (siglas en inglés)
<b>KBH<sub>4</sub></b>	Tetrahidroborato de potasio
<b>KCL</b>	Cloruro de potasio
<b>K<sub>2</sub>O</b>	Superóxido de potasio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monopotásico
<b>LPO</b>	Lipoperoxidación
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnesio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub></b>	Acetato de sodio
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio
<b>Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub></b>	Tungstato de sodio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adedina dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	Nitrito de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>NED</b>	N-1-naftiletilendiamina
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal (siglas en inglés)
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>NO<sub>3</sub>Na</b>	Nitrato de sodio
<b>NOX<sub>4</sub></b>	NADPH Oxidasa 4
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>OH•</b>	Hidroxilo
<b>•ON</b>	Monóxido de nitrógeno
<b>ONOO-</b>	Peroxinitrito
<b>ONS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>Prx</b>	Peroxiredoxinas
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RL</b>	Radicales libres
<b>RNS</b>	Especies reactivas al nitrógeno
<b>RO •</b>	Radical alcoxilo



<b>ROO•</b>	Peroxiradicales
<b>ROS</b>	Especies reactivas al oxígeno
<b>Se</b>	Selenio
<b>sGC</b>	Guanilil ciclasa soluble
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SOD Cu-zn</b>	Superóxido dismutasa cobre-zinc
<b>SOD Mg</b>	Superóxido dismutasa manganeso
<b>SOD-ec</b>	Superóxido dismutasa extracelular
<b>TAC</b>	Capacidad antioxidante total
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante (siglas en inglés)
<b>TGR</b>	Tiorredoxina glutatión reductasa (siglas en inglés)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Trx</b>	Tiorredoxina
<b>TrxR</b>	Tiorredoxina reductasa
<b>Vitamina A</b>	Alfa retinol
<b>Vitamina C</b>	Ácido ascórbico
<b>Vitamina E</b>	Alfa tocoferol
<b>VWF</b>	Factor de Von Willebrand
<b>XOR</b>	Xantina oxidorreductasa
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de zinc
<b><math>\gamma</math>-GCS</b>	$\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Singulete de oxígeno
<b>-SH</b>	Grupos sulfhidrilo
<b>3-NT</b>	3-nitrotirosina

## **INDICE**

<b>Agradecimientos</b>	<b>I</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract</b>	<b>VI</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Especies reactivas al oxígeno y sistemas antioxidantes	
<b>2. Enzimas antioxidantes</b>	<b>3</b>
2.1. Superóxido dismutasa	
2.2. Glutación peroxidasa	
2.3. Tiorredoxinas	
<b>3. Antioxidantes no enzimáticos</b>	<b>5</b>
3.1. Glutación	
<b>4. Estrés reductor</b>	<b>5</b>
4.1. Factores que contribuyen al estrés reductor	
4.1.1. Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido	
4.1.2. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	
4.1.3. Nrf2	
4.1.4. Glutación oxidado/reducido	
4.1.5. Hierro	



4.1.6. Selenio	
5. Aspectos básicos de la anatomía y fisiología vascular	9
5.1. Aorta	
5.1.1. Endotelio vascular	
5.2. Óxido nítrico	
5.2.1. Nitritos y nitratos	
6. <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linnaeus Malvaceae	17
7. Reactividad vascular e <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linnaeus	19
<b>8. Justificación</b>	<b>21</b>
<b>9. Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>10. Objetivo general</b>	<b>22</b>
<b>11. Objetivos específicos</b>	<b>22</b>
<b>12. Material y métodos</b>	<b>23</b>
12.1. Muestra animal	
12.1.1. Criterios de inclusión	
12.1.2. Criterios de exclusión	
12.1.3. Tamaño de muestra por grupo experimental	
12.1.4. Formación de grupos y manejo de los animales	
12.1.5. Toma y mediciones de muestras sanguíneas	
12.2. Preparación de la infusión de <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linnaeus	
12.2.1. Determinación de la vitamina C	
12.2.2. Determinación de los polifenoles	



- 12.2.3. Determinación de los flavonoides totales
- 12.2.4. Determinación de las antocianinas totales
- 12.2.5. Extracción de los ácidos grasos
- 12.3. Presión arterial
- 12.4. Reactividad vascular
  - 12.4.1. Cálculo de la reactividad vascular
  - 12.4.2. Curva acumulativa concentración respuesta de acetilcolina en la aorta torácica de rata
  - 12.4.3. Curva acumulativa concentración respuesta de norepinefrina en la aorta torácica de rata
  - 12.4.4. Curvas acumulativas concentración respuesta para valorar la participación de las especies reactivas al oxígeno
- 12.5. Histología de los anillos aórticos
- 12.6. Homogeneización de la aorta torácica
  - 12.6.1. Actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
  - 12.6.2. Determinación de los nitritos y nitratos
  - 12.6.3. Determinación de la 3-nitrotirosina
  - 12.6.4. Concentración del glutatión
  - 12.6.5. Determinación del selenio
  - 12.6.6. Determinación de grupos tioles totales
  - 12.6.7. Determinación de la tiorredoxina reductasa
  - 12.6.8. Actividad de la glutatión S transferasa
  - 12.6.9. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa
  - 12.6.10. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

**13. Análisis estadístico** **40**

**14. Resultados** **40**

- 14.1. Análisis garantizado

- 14.2. Analitos: colesterol, glucosa, insulina, índice HOMA, leptina y triglicéridos.
- 14.3. Presión arterial sistólica en los grupos experimentales
- 14.4. Respuesta de la vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales
- 14.5. Participación del superóxido sobre la respuesta de vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica
- 14.6. Participación del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta de vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica
- 14.7. Histología
- 14.8. Sistemas antioxidantes
  - 14.8.1. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
  - 14.8.2. Nitritos y nitratos
  - 14.8.3. 3-Nitrotirosina
  - 14.8.4. Glutación
  - 14.8.5. Selenio
  - 14.8.6. Tioles
  - 14.8.7. Actividad de la tiorredoxina reductasa
  - 14.8.8. Actividad enzimática de la glutación peroxidasa
  - 14.8.9. Actividad enzimática de la glutación S transferasa
  - 14.8.10. Lipoperoxidación

**15. Discusión** **57**

**16. Conclusiones** **65**

**17. Resumen gráfico** **66**





**18. Referencias** **67**

**19. Anexos** **81**

## LISTA DE CUADROS

1. **Cuadro 1.** Composición de las diferentes infusiones de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus **40**
1. **Cuadro 2.** Características bioquímicas en suero de las ratas experimentales con los diferentes porcentajes de infusión de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus **41**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Participación de equivalentes reductores y enzimas antioxidantes en el estrés reductor	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Anatomía de la aorta	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Anatomía de los vasos sanguíneos	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de acción de diferentes sustancias sobre la contracción y relajación en la célula del músculo liso vascular.	<b>16</b>
<b>Figura 5.</b> Preparación de la infusión de <i>Hibiscus sabdariffa Linnaeus</i>	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Determinación de presión arterial en ratas	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Extracción de la aorta torácica	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> Eliminación de tejido conjuntivo de la aorta torácica	<b>30</b>
<b>Figura 9 A.</b> División de la aorta torácica en anillos	<b>30</b>
<b>Figura 9 B.</b> Colocación de los ganchos de Nicromel en los anillos de la aorta	
<b>Figura 10 A.</b> Anillo aórtico en la cámara de órgano aislado	<b>31</b>
<b>Figura 10 B.</b> Registro de la reactividad vascular	
<b>Figura 11.</b> Presión arterial sistólica en los grupos experimentales.	<b>42</b>



<b>Figura 12.</b> Vasodilatación en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.	<b>43</b>
<b>Figura 14.</b> Participación del $K_2O$ sobre la respuesta de vasodilatación en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.	<b>44</b>
<b>Figura 15.</b> Participación del $K_2O$ sobre la respuesta de vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.	<b>45</b>
<b>Figura 16.</b> Participación del $H_2O_2$ sobre la respuesta de vasodilatación en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.	<b>46</b>
<b>Figura 17.</b> Participación del $H_2O_2$ sobre la respuesta de vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.	<b>47</b>
<b>Figura 18.</b> Fotomicrografías representativas que muestran las fibras elásticas en la pared de la aorta torácica de los diferentes grupos experimentales.	<b>48</b>
<b>Figura 19.</b> Análisis densitofotométrico del grosor de las fibras elásticas de la aorta torácica.	<b>48</b>
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografías representativas que muestran la pared de la aorta torácica de los diferentes grupos experimentales.	<b>50</b>
<b>Figura 21.</b> Análisis densitofotométrico del grosor de la pared de la aorta torácica.	<b>50</b>



<b>Figura 22.</b> Concentración en la aorta torácica de la G6PD con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>51</b>
<b>Figura 23.</b> Concentración en la aorta torácica de los $\text{NO}_3^-$ y $\text{NO}_2^-$ con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>52</b>
<b>Figura 24.</b> Concentración en la aorta torácica de la 3-nitrotirosina con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>52</b>
<b>Figura 25.</b> Concentración en la aorta torácica del GSH con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>53</b>
<b>Figura 26.</b> Concentración en la aorta torácica de Se con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>53</b>
<b>Figura 27.</b> Concentración en la aorta torácica de tioles totales con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>54</b>
<b>Figura 28.</b> Actividad enzimática de la TrxR con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>54</b>
<b>Figura 29.</b> Actividad enzimática de la GPx con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>55</b>
<b>Figura 30.</b> Actividad enzimática de la GST en la aorta torácica con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>55</b>
<b>Figura 31.</b> LPO en la aorta torácica con diferentes porcentajes de infusión de HSL	<b>56</b>



**Figura 32.** Propuesta de las implicaciones fisiológicas de la modulación de la reactividad vascular por estrés reductor asociado al consumo excesivo de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus

**66**

## **ANEXOS**

Artículo. Excessive Consumption <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. Increases Inflammation and Blood Pressure in Male Wistar Rats via High Antioxidant Capacity: The Preliminary Findings	<b>81</b>
Constancia de participación en las VI Jornadas de Investigación del Instituto de Cardiología	<b>83</b>
Carta de autorización del SICUAE-UNAM	<b>84</b>
Carta de autorización del CICUAL-Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”	<b>85</b>



## **Modulación de la reactividad vascular por estrés reductor asociado al consumo excesivo de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Malvaceae)**

### **1. INTRODUCCIÓN**

El equilibrio redox es esencial para la homeostasis celular. Se ha prestado mucha atención al estrés oxidativo (EO) y se han publicado muchos artículos y trabajos en múltiples sistemas, por ello, las rutas metabólicas de los radicales libres (RL) y su participación en las mismas se encuentra bien establecido. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de manera moderada conduce a efectos benéficos como segundos mensajeros (Steinberg, 2013; Taverne *et al.*, 2013). Sin embargo, la depleción de ROS y/o la sobreproducción de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos pueden conducir a estrés reductor (ER) con consecuencias patológicas, representado por un exceso de equivalentes reductores, como la relación glutatión reducido (GSH)/glutatión oxidado (GSSG) y nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) que pueden agotar todos los ROS, lo que conduce a la contrapartida del EO (Singh *et al.*, 2015).

#### **1.1. Especies reactivas al oxígeno y sistemas antioxidantes**

Los ROS incluyen el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH\bullet$ ), radical alcoxilo ( $RO\bullet$ ), peroxiradical ( $ROO\bullet$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), óxido nítrico ( $NO$ ), monóxido de nitrógeno ( $\bullet ON$ ) peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y singulete de oxígeno ( $^1O_2$ ). Se pueden generar los ROS en varios sitios intracelulares, que incluyen mitocondrias, peroxisomas, membrana plasmática, retículo endoplásmico y citoplasma (Valko *et al.*, 2007).

Los ROS son el resultado de diferentes vías que incluyen los complejos mitocondriales de la cadena respiratoria I y III, xantina oxidasa, NAD(P)H oxidasa, citocromo P450 y desacoplamiento de la NO sintasa endotelial (eNOS), y sobreexpresión de la NO inducible (iNOS) (Griendling *et al.*, 2000). El equilibrio redox es necesario para la homeostasis celular y la producción moderada de ROS



pueden actuar como segundos mensajeros entre ellos están; NO,  $\bullet$ ON y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los ROS pueden modificar proteínas postraduccionalmente, alterando su conformación, estabilidad, actividad y/o capacidad para interactuar con otras proteínas, modulando así la función celular. Algunas proteínas que son sensibles a los efectos de los ROS incluyen proteínas involucradas con los canales de calcio, proteínas contráctiles, proteínas involucradas en diversas vías de señalización y proteínas con actividades transcripcionales (Steinberg, 2013; Taverne *et al.*, 2013).

Por ejemplo, el NO y el  $\bullet$ ON pueden actuar como moléculas mensajeras que contribuyen a la vasodilatación aórtica (Benhar *et al.*, 2005). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede modular la transducción de señales por la oxidación reversible de cisteínas que tiene actividad redox (Rhee *et al.*, 2005). En células de mamíferos, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede activar al menos 40 productos génicos (Grune, 2002). Además, el nivel no citotóxico de ROS (concentraciones picomolares) se garantiza mediante sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que participan de manera importante en la homeostasis de los procesos redox celulares (Valko *et al.*, 2007). Si el “equilibrio redox” se modifica 30 mV representará un cambio de 10 veces entre la proporción de especies reductoras y oxidantes (Valko *et al.*, 2007).

Por otra parte, los sistemas antioxidantes no enzimáticos incluyen; GSH, ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ - y  $\beta$ -tocoferol (vitamina E),  $\alpha$ -retinol, (vitamina A), licopeno, ubiquinol-10,  $\beta$ -caroteno, melatonina, ácido úrico soluble en agua, piruvato, y bilirrubina (Helmut, 1997). El sistema enzimático incluye la super óxido dismutasa (SOD) con sus tres isoformas; SOD cobre-zinc (SOD Cu-Zn), SOD manganeso (SOD Mn) y SOD extracelular (SOD-ec), catalasa (CAT) y enzimas que emplean GSH como las isoformas de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S transferasa (GST), glutatión reductasa (GR), glutarredoxina (Grd) y tioredoxina reductasa (TrxR) (Sharapov *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente las células cuentan con los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, a continuación, se mencionan brevemente las características principales de algunos de ellos.

## **2. Enzimas antioxidantes**

### **2.1. Superóxido dismutasa**

La SOD es considerada una metaloenzima ya que utiliza cofactores metálicos, cuya función es catalizar la reducción del radical libre  $O_2^-$  a oxígeno ( $O_2$ ) y  $H_2O_2$ . La SOD se clasifica de acuerdo a la diferencia que existe en sus cofactores metálicos y a su localización, dividiéndose en SOD CU-Zn localizada en el citoplasma, SOD-Mn ubicada en la mitocondria y SOD-ec en fluidos extracelulares (Birben *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2017).

### **2.2. Glutación peroxidasa**

Es una familia de enzimas de las cuales algunas isoformas utilizan como cofactor al selenio (Se) y su función es catalizar la reducción del  $H_2O_2$  y/o los hidroperóxidos orgánicos en agua o alcohol respectivamente, utilizando GSH como agente reductor. GPx1-4 tiene la presencia de selenocisteína en el sitio catalítico, esta característica garantiza una reacción rápida con los hidroperóxidos y que pueda ser reducido por el GSH, mientras que GPx5-8 sustituyen la selenocisteína por cisteína (Flohé and Maiorino, 2013).

Cada isoforma de GPx se encuentra distribuida en diferentes sitios: GPx1 se localiza en el citosol y las mitocondrias; GPx2 en el epitelio intestinal; GPx3 en el plasma; GPx4 con tres isoformas se encuentra en mitocondrias, núcleo, citosol y parece proteger las membranas celulares del EO; GPx5 se ubica en el epidídimo; GPx6 está en el epitelio olfativo; GPx8 es una proteína de membrana (Flohé and Maiorino, 2013). Cabe mencionar que GPx7 y GPx8 son consideradas como CysGPxs, es decir, no utilizan al GSH como agente reductor, es su lugar utilizan a las llamadas redoxinas, utilizando mayoritariamente a las tioredoxinas (Flohé and Maiorino, 2013).

### 2.3. Tiorredoxinas

El sistema tiorredoxina comprende a la NADPH, la tiorredoxina reductasa (TrxR) y tiorredoxina (Trx), que se encargan de reducir los grupos tioles entre las cisteínas de las proteínas, además de proporcionar los electrones a las peroxidases dependientes de tiol (peroxirredoxinas) (Lu and Holmgren, 2014; Branco and Carvalho, 2018).

Las Trx son pequeñas reductasas, las cuales se encargan de catalizar el cambio de disulfuro/ditiol de las proteínas (Lu and Holmgren, 2014). Trx1 en el núcleo participa en la regulación de diversas enzimas y factores de transcripción mediante la reducción de los residuos de Cys en el dominio de unión al DNA (Arnér, 2009; Tapiero *et al.*, 2003; Whayne *et al.*, 2015; Branco and Carvalho, 2018).

Las TrxR son flavoproteínas con una masa molecular de 112 kDa y derivadas de la familia de las piridinas nucleótido-disulfuro oxidorreductasas, en la que se incluye la GR, la alquil hidroperóxido reductasa, la lipoamida deshidrogenasa y la mercurina reductasa (Lu and Holmgren, 2014). La presencia del selenotiol (en la enzima reducida) es indispensable para la actividad de TrxR, además, esta enzima puede reducir diversos sustratos como peróxidos lipídicos,  $H_2O_2$ , ácido lipoico, deshidroascorbato, 5,5´Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB), selenocisteína, ubiquinona o proteína disulfuro isomerasa (Lu and Holmgren, 2014).

En humanos se han identificado tres isoformas de TrxR con diferentes ubicaciones: TrxR1 en el citosol de la célula en la mayoría de los tejidos; TrxR2 ubicado en las mitocondrias y tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) que se encuentra en los testículos. Los genes que codifican para las TrxR les proporcionan sus diversas características, TrxR1 (gen TXNDR1) tiene afinidad amplia por diversos sustratos ya que puede reducir tanto a Trx1 y Trx2; TrxR2 (gen TXNRD2) posee mayor afinidad por sustratos relacionados con la mitocondria como Grx2 y citocromo C (Branco and Carvalho, 2018). La TrxR2 es fundamental para mantener la Trx2 en su forma reducida utilizando los electrones de la NADPH. De la misma



forma, la Trx2 es cofactor de la peroxiredoxina 3 (Prx3) y la peroxiredoxina 5 (Prx5) ubicadas en la mitocondria y las cuales se encargan de reducir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{ONOO}^-$  (Kameritscj *et al.*, 2021).

### **3. Antioxidantes no enzimáticos**

#### **3.1. Glutación**

El GSH es un tripéptido formado por cisteína, ácido glutámico y glicina es abundante en el citosol, núcleo y mitocondria, es antioxidante soluble en los compartimientos de la célula, protege a la célula del daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las enzimas que intervienen en su síntesis son la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y la glutación sintetasa. Presenta interacción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina C, E y SOD. Asimismo, el GSH actúa atrapando radicales  $\text{OH}\cdot$  y  $\text{O}_2^-$ , reactivando enzimas que son inhibidas a concentraciones altas de oxígeno. Dentro de las características de esta enzima se encuentra el enlace  $\gamma$ -glutamilo que impide que el GSH sea hidrolizado por las  $\alpha$ -peptidasas y el grupo tiol que le permite reaccionar con algunas sustancias, entre ellas los xenobióticos (Cisneros *et al.*, 2011; Zitka *et al.*, 2012).

#### **4. Estrés reductor**

Por otra parte, el ER es la contraparte del EO y consiste en el aumento anormal de equivalentes reductores en presencia de sistemas intactos de oxidación y reducción (Singh *et al.*, 2015). El exceso de equivalentes reductores en forma de parejas redox  $\text{NAD}/\text{NADH}^+$ ,  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  y  $\text{GSH}/\text{GSSG}$  o la sobreexpresión de los sistemas enzimáticos antioxidantes pueden agotar las ROS (Zhang *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015). Los equivalentes reductores en exceso disminuyen las respuestas de crecimiento celular, inducen alteraciones en la formación de enlaces disulfuro en proteínas, reducen la función mitocondrial, disminuyen el metabolismo celular y contribuyen al desarrollo de algunas enfermedades que están estrechamente asociadas a afecciones inflamatorias como cardiomiopatía por agregación de proteínas, miocardiopatía hipertrófica, distrofia muscular,



hipertensión pulmonar, artritis reumatoide, cáncer y síndrome metabólico (SM), entre otros, además el ER crónico puede inducir EO por regulación de retroalimentación positiva (Zhang *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015). Algunos factores que contribuyen al desarrollo de ER se mencionan a continuación (Figura 1):

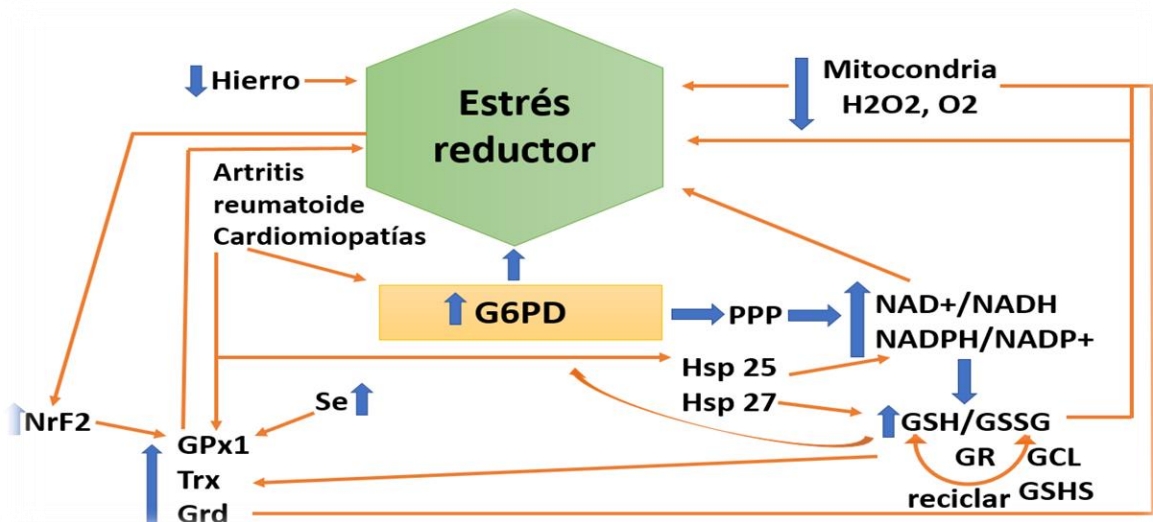


Figura 1. Participación de equivalentes reductores y enzimas antioxidantes en el estrés reductor (Pérez-Torres *et al.*, 2017).

#### 4.1. Factores que contribuyen al estrés reductor

##### 4.1.1. Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado / nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADPH es un cofactor encargado de donar electrones e hidrógenos en diversas reacciones catalizadas por algunas enzimas. La sobreproducción de NADH induce presión sobre los electrones en el complejo mitocondrial I, respondiendo dentro de su capacidad para oxidarse y convertir NADH a NAD<sup>+</sup>. Este evento, provoca aumento en la fuga de electrones y por consiguiente disminuye el oxígeno disponible para producir O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Los elevados niveles de equivalentes reductores, tales como NADH, favorece un ambiente oxidativo. Sin

embargo, se logra la transición a ER, por medio de la ruta del poliol (Pérez-Torres *et al.*, 2017). La ruta del poliol también conocida como ruta del sorbitol, es una ruta alterna del metabolismo de la glucosa, en donde la conversión de glucosa a glucosa 6 fosfato (G6P) por la hexocinasa es dependiente de la concentración plasmática de insulina, mientras que la generación de sorbitol es independiente del mismo y depende exclusivamente de la concentración disponible de glucosa no fosforilada (Blanes *et al.*, 2002).

#### **4.1.2. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa**

La G6P es una enzima limitante para diversos procesos, ya que puede ser utilizada en la glucólisis para producir energía en forma de ATP y NADH, para almacenar energía en forma de glucógeno o se puede utilizar en la vía de las pentosas (Stanton, 2012). La regulación de la G6PD está condicionada por la relación NADPH/NADP, la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) se activa después de la exposición de la célula a diversos oxidantes extracelulares que conllevan a la disminución de la concentración de NADPH, por lo cual se considera que la G6PD tiene efecto antioxidante (Stanton, 2012).

#### **4.1.3. Nrf2**

El Nrf2 es un miembro de la familia “Cap-n-Collar”, con siete dominios funcionales (Neh 1-7) los cuales están encargados de regular su actividad transcripcional y/o estabilidad (Bellezza *et al.*, 2018). El dominio N-terminal a concentraciones bajas ( $K_D \sim 5nM$ ) se encarga de su interacción con Keap1, el dominio Neh5 regula su localización dentro de la célula, el dominio Neh6 controla la degradación independiente de Keap1 de Nrf2, mientras que el dominio Neh1 permite la unión del Nrf2 a la secuencia del elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Keum and Choi, 2014).

Un estudio en ratones demostró que el Nrf2 está implicado en la señalización para la transcripción de enzimas antioxidantes tales como SOD, GST, GPx, GR, entre otras (Dong *et al.*, 2008). Además de Keap-1, Nrf2 se encuentra regulado por

la autofagia y la proteína p62 (encargada de regular de manera negativa al Nrf2 mediante Keap-1), una proteína de unión a la ubiquitina que actúa como andamiaje para diversos agregados de proteínas (Bellezza *et al.*, 2018). La alteración de alguno de los mecanismos antes mencionados, puede provocar la activación sostenida y la translocación nuclear del Nrf2 generando una regulación transcripcional incesante de enzimas antioxidantes que favorecen la presentación de ER (Pérez-Torres *et al.*, 2017).

#### **4.1.4. Glutación reducido/glutación oxidado**

En presencia de ROS, el GSH se oxida a GSSG para posteriormente reducirse por la GR a GSH; por lo que, el índice de GSH/GSSG es un marcador de toxicidad celular. El GSH en el plasma se encuentra en concentraciones micromolares, mientras que, las concentraciones intracelulares están en rango milimolar (Zitka *et al.*, 2012). El exceso de GSH podría disminuir los ROS y favorecer el ER (Pérez-Torres *et al.*, 2017).

#### **4.1.5. Hierro**

El hierro es un importante catalizador en diversas reacciones, conocidas como reacciones Fenton y Haber Weiss. La alteración en la homeostasis del hierro se ha asociado con disfunción mitocondrial, ya que las mitocondrias utilizan aproximadamente 90% del oxígeno celular, que resulta en la producción de ROS (Domínguez *et al.*, 2017). Por mencionar algunos, los ROS con los que interacciona el hierro son  $H_2O_2$  y el  $OH\bullet$ , que se reducen a  $H_2O$  (actividad antioxidante) o se oxidan, como superóxido con reducción análoga de  $Fe^{III}$  a  $Fe^{II}$ . La disminución de hierro intracelular disminuye o altera las reacciones que involucran la generación de ROS y puede favorecer la aparición de ER (Tewari *et al.*, 2013).



#### **4.1.6. Selenio**

El Se es un metaloide y componente esencial del sitio activo de algunas enzimas con actividad antioxidantes que se conocen como selenoproteínas, como la familia de las GPxs, la TrxR y las yodotironina deiodinasas (IDD) (Roman *et al.*, 2014). Todas las selenoproteínas a excepción de la SeIP cuentan con un residuo de SeCys que define su actividad bioquímica, por lo que, la alteración en la homeostasis de este oligoelemento podría alterar la capacidad antioxidante (Tonggi, 2008).

### **5. Aspectos básicos de la anatomía y fisiología vascular**

Por otra parte, los vasos sanguíneos se clasifican de acuerdo a su función, ubicación y el tamaño de las arterias, venas y capilares. En forma general y dependiendo del calibre de los vasos sanguíneos, se pueden identificar tres capas: íntima (cara interna), media (túnica media) y adventicia (capa externa) (Sandoo *et al.*, 2010).

A su vez, las arterias se pueden dividir de acuerdo a sus características anatómicas en arterias conductoras o arterias elásticas; arterias musculares o arterias de distribución y arterias de resistencia. Algunos ejemplos de arterias conductoras son la aorta, la arteria pulmonar y la carótida, cuyo distintivo es poseer gran cantidad de tejido elástico que les permite expandirse y contraerse de acuerdo a los cambios oscilatorios en la presión arterial (Mc Eniery *et al.*, 2007). Las arterias conductoras se ramifican en arterias de distribución, como la arteria braquial, la radial y la femoral, estas arterias son las encargadas de dirigir el flujo sanguíneo a regiones particulares del cuerpo (Pugsley and Tabrizchi, 2000; Sandoo *et al.*, 2010). Las arterias de distribución se dividen en arterias de resistencia y forman parte de la microcirculación (Sandoo *et al.*, 2010).





## 5.1. Aorta

La aorta es la arteria más grande en el organismo de los animales y humanos, cualquier alteración en la estructura y/o función de la aorta puede ocasionar disturbios en el sistema cardiovascular (Berillis, 2013).

La aorta se divide en 5 secciones:

- Aorta ascendente
- Arco aórtico
- Aorta descendente
- Aorta torácica
- Aorta abdominal (Berillis, 2013).

La pared de la aorta presenta tres tunicas: íntima (endotelio vascular), media y adventicia. Además, se pueden distinguir otros componentes como las láminas elásticas y colágeno que están íntimamente relacionadas con las células del músculo liso. Tanto el colágeno como la elastina determinan la resistencia a las fuerzas de tracción y rigidez de la aorta. Las propiedades mecánicas de la aorta dependen de las cantidades de los componentes principales, así como de la organización espacial (determinadas por proteínas de adhesión de la matriz extracelular y sus receptores de membrana) y de las interacciones mecánicas entre estos componentes (Silver *et al.*, 2001; Laurent *et al.*, 2006).

La propiedad mecánica más importante de la pared de la aorta es su elasticidad no lineal, que se explica por la “Ley de Hooke”. La Ley de Hooke se aplica para tejidos biológicos (ligamentos, tendones, vasos sanguíneos, entre otros) que presentan un comportamiento no lineal de deformación por acción de esfuerzo-deformación, esta característica se relaciona con los efectos viscoelásticos, que involucran un fuerte estrés inicial para producir una deformación inicial, conocido como módulo de Young, posteriormente, la tensión-deformación sigue una tendencia lineal hasta que nuevamente se requiere aplicar tensiones mayores para



generar un aumento drástico de la deformación, previo a la falla del material de manera irreversible (Tabernero *et al.*, 2019).

### **5.1.1. Endotelio vascular**

El endotelio vascular es una monocapa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos de todo el sistema cardiovascular. Este se encarga de gran variedad de funciones como el manejo de la permeabilidad microvascular, la coagulación, la inflamación, el tono vascular, la vasculogénesis, la angiogénesis, por mencionar algunos (Endemann and Schiffrin, 2004; Jamwal and Sharma, 2018). Además, para controlar la reactividad vascular; las células endoteliales, que se ubican en la íntima, son metabólicamente activas y liberan diversos mediadores vasoactivos como el NO, el factor de contracción dependiente del endotelio (EDCF), el factor relajante dependiente del endotelio (EDRF), los tromboxanos, los endoperóxidos, el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF), los prostanoïdes, el factor de Von Willebrand (VWF) (Janus *et al.*, 2016; Sandoo *et al.*, 2010). La homeostasis en la producción de estas sustancias es ateroprotectora, ya que el desequilibrio puede generar disfunción endotelial, que es un indicador previo al desarrollo de aterosclerosis (Sandoo *et al.*, 2010).

Así mismo, las células endoteliales están constantemente expuestas a varios estímulos entre los que podemos destacar lipoproteínas oxidadas, fuerzas de fricción, agentes inflamatorios, citocinas, y ROS (Baños *et al.*, 1993). La alteración en la estructura y/o función de las células endoteliales conlleva a diversas patologías como los diferentes tipos de cardiomiopatías (Janus *et al.*, 2016). En las figuras 2 y 3 se observa la anatomía de la aorta.



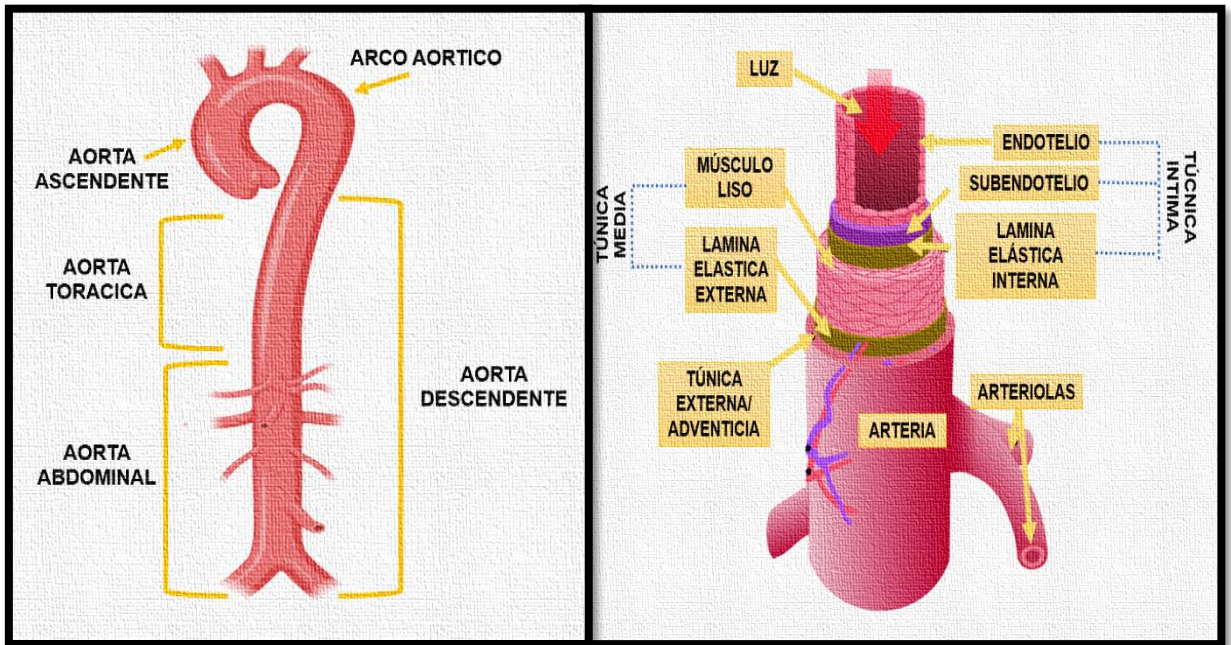


Figura 2. Anatomía de la aorta (Berillis, 2013).

Figura 3. Anatomía de los vasos sanguíneos (Tortora and Grabowski, 2003).

## 5.2. Óxido nítrico

El NO es una molécula pequeña con un electrón desapareado en el orbital  $2\pi^*$ , además es considerado el principal vasodilatador y se sintetiza a partir de la arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), posee propiedades antiinflamatorias, antiaterogénicas, antifibrinolíticas y antiapoptóticas, además de evitar la agregación plaquetaria. (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007; Jamwal and Sharma, 2018).

En medios acuosos la vida media de NO es de escasos segundos. Sin embargo, en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno el tiempo de vida media es mayor (>15 seg) (Valko *et al.*, 2007). Las características mencionadas anteriormente le permiten ser soluble en medios hidrofílicos como hidrofóbicos, difundiendo fácilmente a través del citoplasma y las membranas plasmáticas (Valko *et al.*, 2007).



Se conocen tres isoformas de la NOS las cuales adquieren diversas denominaciones de acuerdo al sitio de producción: eNOS, se produce en el endotelio vascular (túnica íntima); óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), se localiza en el tejido nervioso e iNOS, la cual es la isoforma inducible, se sintetiza principalmente en macrófagos y neutrófilos (Pacher *et al.*, 2007; Taverne *et al.*, 2013). La eNOS y la nNOS requieren iones de calcio, se localizan en el citoplasma y son consideradas enzimas constitutivas, ya que, se producen de manera continua, mientras que, la iNOS se activa por procesos patológicos e inflamación (Pacher *et al.*, 2007; Taverne *et al.*, 2013). Las diferentes isoformas se clasificaron de acuerdo a los sitios donde se identificaron por primera vez. Sin embargo, la producción de estas isoformas también se ha observado en otro tipo de células como en los miocitos cardíacos, el músculo esquelético, las plaquetas sanguíneas y el hipocampo (Sandoo *et al.*, 2010).

La eNOS se encuentra unido a la proteína caveolina dentro de pequeñas invaginaciones de la membrana celular conocido como caveolas, para activarse necesita separarse de la caveolina; a corto plazo, algunos agonistas del NO pueden favorecer el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplasmático como acetilcolina (ACh), bradiquinina (BK), trombina, entre otros. Cuando se agotan los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , se envía una señal a los receptores de membrana dando lugar a un proceso conocido como “*entrada capacitativa de calcio o entrada de calcio operada por depósitos*” (Sandoo *et al.*, 2010).

El NO sintetizado por la eNOS requiere del aminoácido L-arginina el cual utiliza como cofactores al  $\text{Ca}^{2+}$ calmodulina y NADPH (Rivero-Vilches *et al.*, 2001; Fleming and Busse, 2003). En general, la producción de NO depende de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular del retículo endoplasmático y del extracelular. La reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve que el complejo de calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  se disocie de eNOS, provocando la unión a la caveolina para inactivarse nuevamente y viceversa (Sandoo *et al.*, 2010).



A largo plazo, cuando disminuyen los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se activa el mecanismo de fosforilación de eNOS, a través de las proteínas quinasas, entre las que se encuentra la proteína quinasa A y la proteína quinasa II dependiente de guanosina 3',5-monofosfato cíclico (cGMP). La fuerza que la sangre ejerce sobre la pared de las arterias también conocido como "shear stress", es el resultado del aumento de flujo sanguíneo en el vaso y puede aumentar la producción de NO mediante la fosforilación de eNOS por acciones de la proteína quinasa B (akt), pero también puede estimular los receptores de las células endoteliales y permitir la adherencia a los mismos de algunos agonistas provenientes de la sangre aumentando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sandoo *et al.*, 2010).

En particular, el "shear stress" activa los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie de la célula endotelial, causando la salida de  $\text{K}^+$  y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Cuando la tensión que la sangre ejerce sobre la pared de los vasos sanguíneos es breve provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que si esta tensión se prolonga (>30 minutos) las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyen, por lo que la producción de NO depende de la fosforilación de eNOS (Taverne *et al.*, 2013).

Una vez sintetizado, el NO pasa de la célula endotelial hacia el músculo liso adyacente, donde se une a la enzima guanilil ciclasa soluble (sGC), esta enzima presenta en su estructura un grupo hemo que se encarga de reconocer al NO (Rivero-Vilches *et al.*, 2001; Fleming and Busse, 2003). La interacción de estos componentes mejora la tasa de conversión de guanosina trifosfato (GTP) a cGMP lo que disminuye la tensión del músculo liso (Tsutsumi *et al.*, 1999). Además, cGMP reduce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico en la célula del músculo liso y a su vez, restaura los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambas acciones reducen la contracción de las células musculares lisas (Sandoo *et al.*, 2010). La figura 4 describe este proceso.



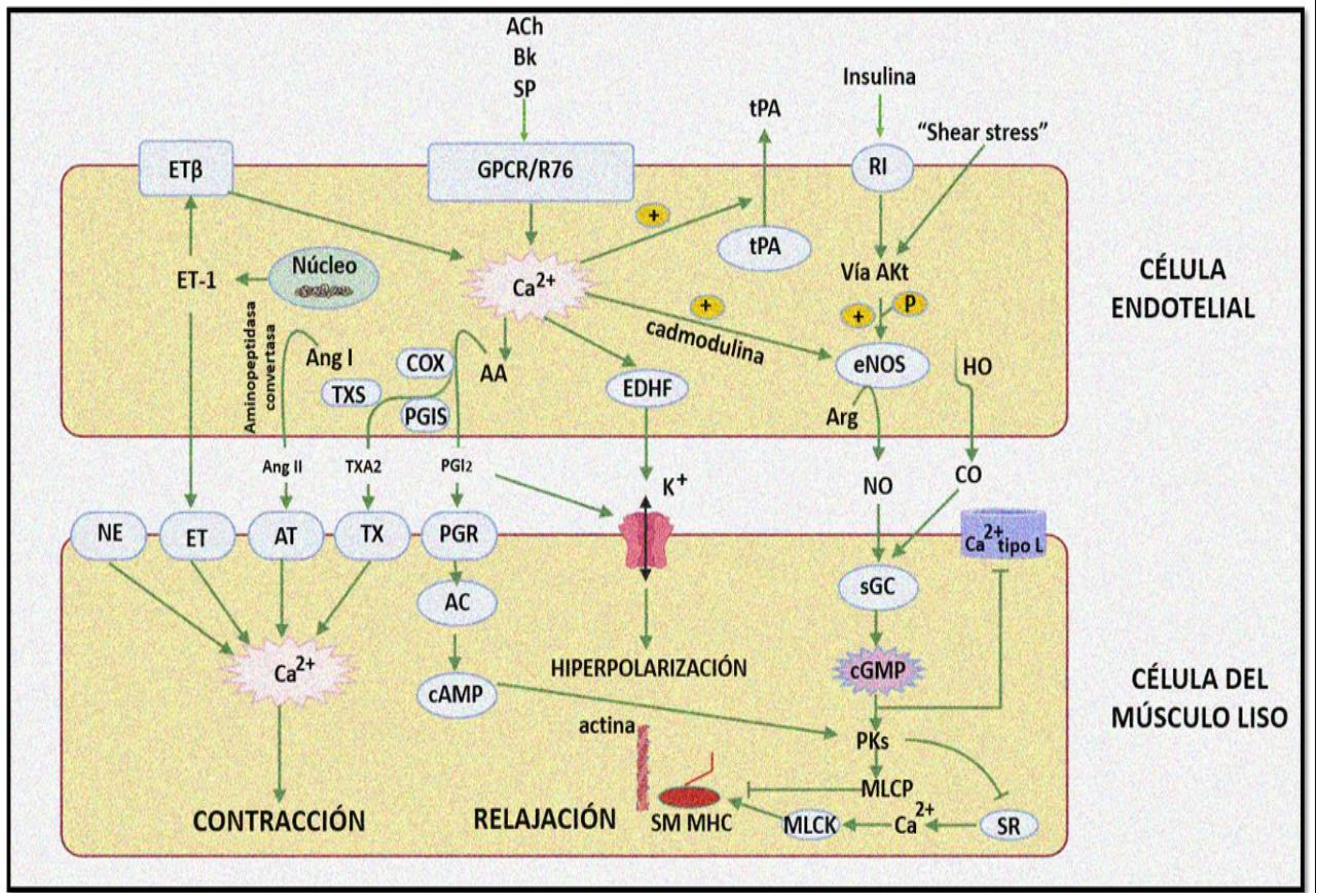
### 5.2.1. Nitritos y nitratos

Los  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  son los productos finales de la vía de oxidación del NO, la determinación de sus concentraciones hematológicas es utilizada como índice de la producción sistémica de NO. El  $\text{NO}_2^-$  es considerado una molécula de señalización, ya que es un intermediario para la generación de NO, ya sea en el estómago en pH ácido o por la acción con la desoxihemoglobina, induciendo vasodilatación (DeMartino *et al.*, 2019). Asimismo, el  $\text{NO}_2^-$  puede inhibir la actividad del complejo mitocondrial I de la cadena transportadora de electrones mediante la S-nitrosación, disminuyendo la generación de ROS, evitando los cambios de permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo C (Waltz *et al.*, 2015).

El  $\text{NO}_3^-$  se genera rápidamente a partir de la reacción del NO con hemoproteínas oxigenadas en un proceso denominado NO-dioxigenación, este proceso desintoxica al sistema cardiovascular del exceso de NO tóxico. La vida media del NO es corta, sin embargo, el  $\text{NO}_3^-$  generado simultáneamente se utiliza nuevamente para la producción de NO (DeMartino *et al.*, 2019).







**Figura 4. Mecanismos de acción de diferentes sustancias sobre la contracción y relajación en la célula del músculo liso vascular.** Abreviaciones: Ach: Acetilcolina; BK: Bradicینina; SP: Sustancia P; tPA: Activador del plasminógeno tisular; GPCR: Receptor acoplado a proteínas; RI: Receptor de insulina; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; EDHF: Factor de hiperpolarización derivado del endotelio; Ang: Angiotensina; AA: Ácido araquidónico; COX: Ciclooxygenasa; TXS: Tromboxano sintasa; PGIS: Prostaglandina sintasa; Arg: arginina; HO:Hemoxygenasa; CO: Monóxido de carbono; NE: Receptor de noradrenalina; ET: Receptor de endotelina; AT: Receptor de angiotensina; TX: Receptor de tromboxano; PGR: Receptor de prostaglandina; AC: Adenilato ciclasa; cAMP: monofosfato de adenosina; sGC: enzima soluble guanilil ciclasa; cGMP: 3'5' guanosina monofosfato cíclico; PKs: Proteína quinasa; MLCK: Miosina quinasa de cadena ligera; SM MHC: Cadena pesada de miosina del músculo liso; SR: Retículo sarcoplásmico. (Sandoo *et al.*, 2010).



## 6. *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Malvaceae

Por otra parte, la *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Malvaceae (HSL) también conocida como flor de Jamaica ha sido utilizada en diversas preparaciones; los cálices frescos o secos sirven para la preparación de diferentes bebidas; en Sudán y Nigeria, estos cálices se hierven con azúcar para generar una bebida conocida como “Karkade o Zoborodo”. En México esta bebida es conocida como “agua de Jamaica” o “té de Jamaica” (Norhaizan *et al.*, 2010; Costa-Rocha *et al.*, 2014).

En la medicina tradicional de algunos países, por ejemplo, en China se emplea como tratamiento para pirexia, hipertensión y daño hepático, debido a su alto contenido de ácido protocatecuico; además, su extracto de cáliz se utiliza como tratamiento para pacientes con cálculos renales por su efecto uricosúrico (Tseng *et al.*, 2000; Prasongwatana *et al.*, 2008). En India, África y México las infusiones de las hojas o cálices se usan por sus efectos diuréticos, coleréticos, hipotensivos y por estimular el peristaltismo intestinal (Costa-Rocha *et al.*, 2014).

Los cálices de HSL contienen muchos componentes químicos incluyendo polifenoles, ácidos polifenólicos, quercetina, ácido gálico y flavonoides que han sido utilizados contra el EO. Se ha descrito que los polifenoles de HSL protegen a los componentes celulares del daño por oxidación, disminuyendo la lipoperoxidación (LPO) por captura de RL (Sousa *et al.*, 1985), incrementa la actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD, participa en la regeneración de vitamina C y E, incrementa la concentración del GSH reducido, inhibe la actividad de las enzimas xantina-oxidasa y la enzima convertidora de angiotensina, tiene efecto antiinflamatorio al actuar sobre la modulación de la ciclooxigenasa 2 e iNOS evitando la síntesis de la prostaglandina E<sub>2</sub> y del NO respectivamente (Rees *et al.*, 1989), evita la apoptosis de las células hepáticas por inhibición de la activación de los factores de transcripción p-JNK y p38 MAPK activados durante la inflamación, baja los niveles séricos de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad e incrementa las lipoproteínas de alta densidad, aminora la hiperglucemia y la deposición de los





productos de la glicosilación avanzada, inhibiendo el desarrollo y/o la progresión de la aterosclerosis (Ikeda *et al.*, 1997).

En general, se puede decir que los polifenoles de HSL tienen actividad cito-protectora y efectos preventivos contra el EO *in vitro* e *in vivo*; sin embargo, también pueden mostrar actividades pro-oxidantes cuando se consumen a dosis elevadas o cuando los iones metálicos están presentes (Wätien *et al.*, 2005). Por lo que su concentración determina su actividad pro-oxidante y/o antioxidante. Se han publicado actividades pro-oxidativas de varios polifenoles, como la quercetina, las catequinas y el ácido gálico (Sergediene *et al.*, 1999). Diversos estudios han mostrado que la supervivencia y la viabilidad celular, el contenido de tioles, la capacidad antioxidante total y las actividades de SOD, CAT, GST se redujeron con quercetina a 50  $\mu\text{M}$  (Robaszkiewicz *et al.*, 2007). Los niveles elevados de flavonoides (50-250  $\mu\text{M}$ ) produjeron citotoxicidad, daño al ADN, apoptosis y presencia de ROS por auto oxidación (Hodnick *et al.*, 1986).

Los antioxidantes fenólicos a altas concentraciones exhiben actividades pro-oxidantes cuando los iones de metales de transición, como el hierro y el cobre, están presentes formando quelantes y reduciendo la capacidad antioxidante (Decker., 1997). Los antioxidantes fenólicos se convierten en radicales fenoxilo en sistemas biológicos, estos radicales pueden ser la base de una cascada de eventos pro-oxidativos que se caracterizan en primer lugar por la auto oxidación de un difenol o polifenol concomitante con reducción univalente de oxígeno molecular, seguida de la dismutación de la formación de  $\text{O}_2^-$  y la posterior formación de  $\text{OH}\cdot$  en una reacción de tipo Fenton (Passi *et al.*, 1987). Estos compuestos difenólicos son más citotóxicos que las sustancias monofenólicas porque producen cantidades mucho mayores de metabolitos de oxígeno reactivos en el espacio extracelular (Laughton *et al.*, 1989).

La quercetina es un flavonoide que puede conducir a la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la auto oxidación (Laughton *et al.*, 1989). Además, se ha observado un



exceso de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en microsomas con varios antioxidantes fenólicos tales como quercetina y galatos (Sousa *et al.*, 1985).

### **7. Reactividad vascular e *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Malvaceae**

Asimismo, un estudio determinó los efectos de la infusión de HSL en la reactividad vascular en ratas con síndrome metabólico (SM) y ratas con SM tratadas con HSL, donde se observó que en los anillos de aorta de las ratas con SM más HSL disminuyó la respuesta de vasoconstricción y aumento la respuesta de vasorelajación. Además, se observó aumentó en la expresión de eNOS y en la concentración de los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en comparación con las ratas con SM sin tratamiento. Los resultados de este estudio sugieren que la HSL puede tener injerencia en la sobreexpresión de la eNOS, que se refleja en la respuesta vasorelajante y por consiguiente en la disminución de la presión arterial (Pérez-Torres *et al.*, 2014).

Otro estudio mostró que el extracto de HSL contribuyó a la reducción de la fibrosis cardíaca mejorando la distensibilidad y la relajación ventricular, estos resultados sugieren que el extracto de HSL puede influir en las acciones inotrópicas y cronotrópicas en el corazón de ratas con SM, lo que puede contribuir a la restauración de la resistencia vascular coronaria (CVR) y al rendimiento mecánico cardíaco (CMP), además, estos resultados se vieron reflejados en la disminución de la presión sanguínea de las ratas con SM (Pérez-Torres *et al.*, 2019). Por otra parte, los polifenoles presentes en la HSL pueden activar la vía PI3 K en el endotelio, esta vía se encarga de regular la síntesis de NO mediante la fosforilación de la eNOS, además de disminuir las arritmias cardíacas mediante la regulación de Ca<sup>2+</sup> en los miocitos cardíacos (Pérez-Torres *et al.*, 2019). Sin embargo, la concentración elevada y constante de polifenoles podría mantener activa esta vía con resultados contrarios a los antes mencionados (Pérez-Torres *et al.*, 2019).

Con respecto al efecto pro-oxidante de los agentes fenólicos, recientemente se informó que la infusión al 3% de HSL, se asoció con aumento en la actividad de la



SOD, CAT, GPx y disminución de la lipoperoxidación y carbonilación, en un modelo de rata con SM. Sin embargo, este incremento en las enzimas y marcadores antioxidantes también fue evidente en el grupo control (Zúñiga-Muñoz *et al.*, 2013).

Lo anterior sugiere que la infusión de HSL a concentraciones bajas 2-3% puede disminuir o mejorar los síntomas de las patologías que comprenden el SM, pero en animales clínicamente sanos (control) incrementa la actividad del sistema antioxidante enzimático y no enzimático, con una tendencia discreta en la elevación de la PAS.



## 8. JUSTIFICACIÓN

El consumo de altas concentraciones de antioxidantes provenientes de plantas o productos sintéticos por la población es cada vez mayor sin valorar el impacto fisiológico que esto puede ocasionar a largo plazo. Sin embargo, existen escasas evidencias experimentales que sugieren que el consumo crónico de altas concentraciones de antioxidantes conduce al desarrollo de diversas patologías. Por lo que, en este proyecto se propuso explorar el efecto de diferentes porcentajes de *Hibiscus sabdariffa Linnaeus*, fuente de antioxidantes naturales, sobre la alteración de la reactividad vascular y la posible generación de estrés reductor por el exceso de agentes antioxidantes proporcionados por la *Hibiscus sabdariffa Linnaeus*.

## 9. HIPÓTESIS

El exceso de agentes antioxidantes suministrados por diferentes concentraciones de infusión de *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* al 1.5%, 3% y 6% altera la función vascular al generar la sobreexpresión de equivalentes reductores y/o de los sistemas antioxidantes que eliminarán los ROS y favorecerán el ER, lo que aumentará la presión arterial.



## 10. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés reductor asociado al consumo excesivo de diferentes concentraciones de infusión *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* sobre la modulación de la reactividad vascular por medio de la cámara de órgano aislado.

## 11. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- De acuerdo a las diferentes infusiones de *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* se cuantificó por medio de espectrofotometría la concentración de:
  - ❖ Flavonoides
  - ❖ Antocianinas
  - ❖ Polifenoles
  - ❖ Vitamina C
- Por medio del cromatógrafo de gases se determinó la concentración de ácido oleico y ácido linoleico.
- En la aorta torácica se determinó:
  - ❖ Los índices de reactividad vascular por medio de la cámara de órgano aislado.
  - ❖ Los cambios morfológicos en la pared de la aorta teñidos con la tinción tricrómica de Masson y plata metenamina Jones.
  - ❖ Por medio de ELISA se determinó la concentración 3-nitrotirosina.
  - ❖ Por medio del espectrofotómetro se cuantificó las concentraciones de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, los nitritos y nitratos, el glutatión, la glutatión peroxidasa, la lipoperoxidación, el selenio, los tioles, la tiorredoxina reductasa y la actividad de la glutatión S transferasa.
- Se determinó la bioquímica sanguínea de los diferentes grupos experimentales, grupo control y con *Hibiscus sabdariffa Linnaeus* al 1.5, 3 y 6%.



## 12. MATERIAL Y MÉTODOS

### 12.1. Muestra animal

Este estudio se llevó a cabo en 40 ratas Wistar macho, los procedimientos realizados con los mismos fueron revisados y autorizados por el SICUAE de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (SICUAE.DC-2019/3-4, anexo 3) y el CICUAL del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC/CICUAL/011/2019, anexo 4). Además, de seguir los lineamientos de manejo y contención de esta especie establecidos en la NOM-062-ZOO-1999.

#### 12.1.1. Criterios de inclusión

- Clínicamente sanas.
- Peso de  $300 \pm 50$  g.
- Condición corporal de tres (CC 3/5)

#### 12.1.2. Criterios de exclusión

- Ratas con un peso inferior o superior al requerido.
- Hembras.
- Ratas que clínicamente presenten alguna enfermedad (problemas respiratorios, digestivos, inapetencia, agresividad, entre otros).

#### 12.1.3. Tamaño de muestra por grupo experimental

La medición de la presión arterial sistólica (PAS), es el parámetro inicial y cuantitativo del cual partimos para calcular el número de animales por grupo, en la literatura se indica que la media para la PAS en ratas sanas es de 116 mmHg, mientras que, en las ratas del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez se ha observado que la media para la PAS es de 112.8 mmHg con una varianza de 20.4, con base a esto se estimó el tamaño de la muestra por grupo a través de  $\mu$  (presión arterial sistólica de las ratas Wistar) con confianza del 95% y error máximo (EM) de 3.2 mmHg es decir  $116 \pm 3.2$ .



Con este fin, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{EM: } |\mu - \bar{x}| = |116 - 112.8| = 3.2 \text{ mmHg}$$

$$\text{Confianza: } |\mu - \bar{x}| = |116 - 112.8| = 3.2$$

$$\text{TM: } n = \frac{(\sigma_{\bar{x}})^2 \sigma_x^2}{\text{EM}^2} = \frac{(2^2)(20.4)}{(3.2)^2} = \frac{4 \cdot 20.4}{10.24} = \frac{81.6}{10.24} = 7.96 \simeq 8$$

Donde:

- EM=Error máximo
- $\sigma_{\bar{x}}$ =número de desviaciones estándar del estimador de la media.
- $\sigma_x^2$ =Varianza de la PAS de las ratas del Instituto Nacional de Cardiología.

#### **12.1.4. Formación de grupos y manejo de los animales**

Se usaron 40 ratas Wistar macho para formar 4 grupos con 10 animales cada uno como se indica a continuación: grupo 1, control (agua); grupo 2, HSL 1.5%; grupo 3, HSL 3%; grupo 4, HSL 6%. Los animales estuvieron durante 4 semanas bajo las siguientes condiciones: ciclo de 12 horas luz/12 oscuridad, temperatura ambiente y la humedad relativa entre los rangos de 18-26°C y 40-70% respectivamente. El alimento comercial para roedores adicionado con 23% de proteína cruda, 4.5% de grasa cruda, 6% fibra cruda, 8% cenizas y 2.5% minerales, (Labdiet 5008; PMI Nutrition International, Richmond, IN.) se suministró a libre acceso. La infusión de HSL a las diferentes concentraciones se proporcionó vía oral (*ad libitum*) en el agua de bebida.

#### **12.1.5. Toma y mediciones en la muestra sanguínea**

Las muestras sanguíneas de las ratas se obtuvieron después de realizar la eutanasia por decapitación de acuerdo a lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999, posteriormente se colocó la sangre en tubos sin anticoagulante, se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 3,000 rpm;



finalmente se recuperó el suero y se congeló a -4 °C. El colesterol, la glucosa, la leptina y los triglicéridos fueron determinados por medio de métodos enzimáticos comerciales (PointeScientific USA ®) y la insulina fue determinada mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) (Millipore USA ®), siguiendo los métodos de rutina recomendados por el fabricante.

El índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó con la siguiente fórmula (Borai *et al.*, 2007; Tropf *et al.*, 2017):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina}(\mu\text{U/mL}) * \text{glucosa (Mm)}] / 22.5$$

### 12.2. Preparación de la infusión de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus

Por cada litro de agua en ebullición se le agregaron 15, 30 y 60 g respectivamente de los cálices de HSL (1.5%, 3% y 6%). Se mantuvo hirviendo durante 10 minutos, se dejó enfriar, se filtró y se les proporcionó *ad libitum* a las ratas.

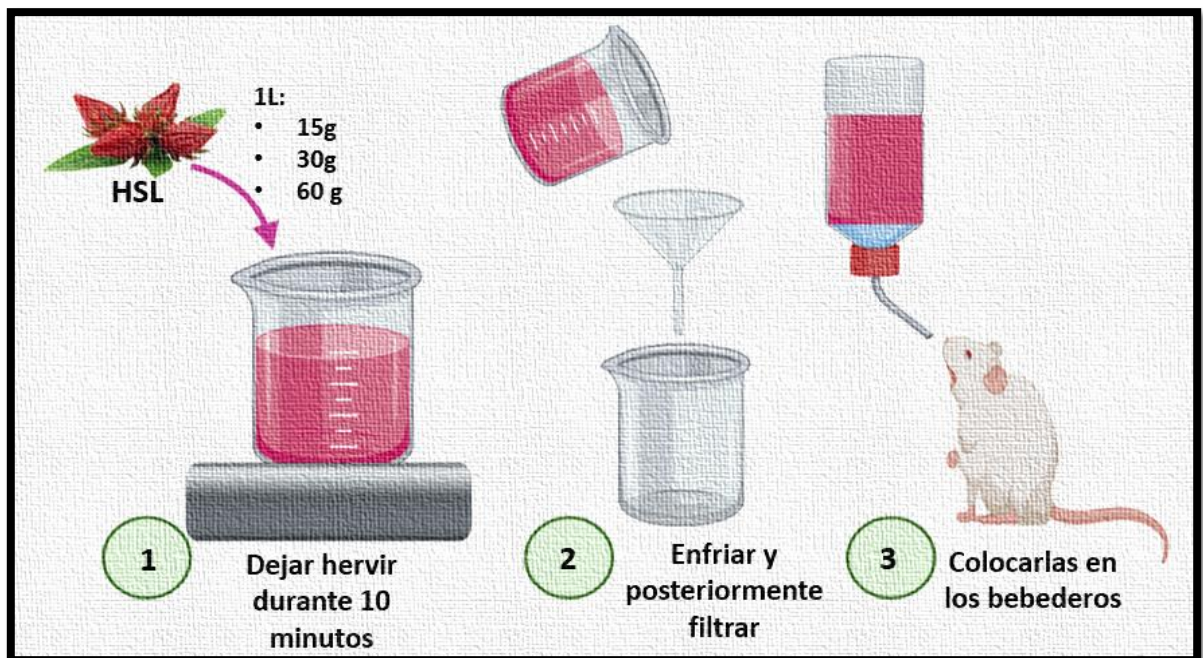


Figura 5. Preparación de la infusión de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus





### **12.2.1. Determinación de la vitamina C**

La vitamina C en la infusión de HSL fue determinada mediante el método de Jagota (1982). Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la infusión a 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu (0.20 mM). La mezcla se homogenizó en el vórtex durante 5 segundos, después se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó mediante espectrofotometría a 760 nm. La curva de calibración se obtuvo utilizando solución estándar de ácido ascórbico (Jagota S. and Dani H., 1982).

### **12.2.2. Determinación de polifenoles**

Esta técnica determina la capacidad con la que cuentan los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, el reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico que reaccionan con cualquier tipo de fenol, dando como resultado la formación de complejos fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ )-fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ). En pH básico, es decir, al agregar carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se reducen de forma reversible los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico y refleja la cantidad de polifenoles expresados como equivalentes del ácido gálico (George S. *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2008; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013).

Para este método se diluyeron 100  $\mu\text{L}$  de la infusión de HSL en agua destilada en proporción 1:10. Después se agregaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N), la mezcla se homogenizó en el vórtex y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 3 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, se incubó nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente, sin embargo, cada intervalo de 5 minutos se homogenizó la muestra. La absorbancia se leyó a 750 nm y se utilizó ácido gálico para obtener la curva de calibración.

### **12.2.3. Determinación de flavonoides totales**

Las flavonas y flavonoles reaccionan con el tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) formando complejos estables como apigenina, crisina y luteonina, así como los flavonoles morina, quercetina, miricetina, kaempferol, quercitina y galangina, que se pueden analizar mediante el espectrofotómetro (Jia *et al.*, 1999).



Los flavonoides totales presentes en la infusión de HSL se determinaron con el método de Jia (Jia *et al.*, 1999). Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de infusión de HSL a 1250  $\mu\text{L}$  de agua destilada más 75  $\mu\text{L}$  de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) al 5% y se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y la solución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  (0.1 M). La curva de calibración se consiguió utilizando quercetina como estándar y la absorbancia se leyó a 510 nm (Jia *et al.*, 1999).

#### **12.2.4. Determinación de antocianinas totales**

Las antocianinas cuentan con diversos pigmentos monoméricos en su estructura que se manifiestan al cambiar el pH (Lee J. *et al.*, 2005; Garzón G., 2008). En pH ácido, esta molécula manifiesta su forma estable conocida como oxonio, el cual es de color rojo intenso, mientras que, en pH básico, la molécula pierde un protón y adiciona agua en su estructura, dando lugar a su forma inestable conocida como hemiacetal la cual no presenta color (Lee *et al.*, 2005; Garzón, 2008).

Para la determinación de las antocianinas se agregó 1 mL de la infusión de HSL a 49 mL de los amortiguadores de  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$  (4 M) a pH 1 Y pH 4.5 respectivamente, la absorbancia se midió a 520 nm y 700 nm y se comparó con una celda blanco que contenía agua destilada. Se realizó la diferencia de absorbancia para calcular la 3-glucosido de cianidina como se describe en el método de Lee (Lee *et al.*, 2005).

#### **12.2.5. Extracción de los ácidos grasos**

Para la extracción de los ácidos grasos (AG), es decir, ácido oleico y ácido linoleico se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de infusión de HSL con 100 mg de ácido nonadecanoico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{COOH}$ ) como estándar interno y cloroformo-metanol (2:1, vol/vol) de butilhidroxitolueno (BHT) al 0.002%, como lo describe Folch and Sloane-Stanley, 1957. Los AG se transesterificaron a sus ésteres metílicos de AG calentándolos a 90 °C durante 2 hrs con metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )



y con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 2% y BHT al 0.002%. Los esteres metílicos se separaron e identificaron por medio de cromatografía de gases en un cromatógrafo Carlo ErbaFratovap 2300 ® equipado con un detector FID y una columna capilar empaquetada con la fase SP-2330 (30 m de longitud y 0.25 mm -0.2  $\mu$ m de espesor de película) utilizando helio como gas portador con un índice de 1.2 mL/min.

### 12.3. Presión arterial

Se tomó la PAS 24 horas previas a la eutanasia por medio de un pletismógrafo. Este aparato consiste en un sistema que utiliza un sensor, colocado en la cola del animal, conectado a un transductor de presión (SPEM) que envía las señales a una computadora equipada con un programa para la captura y procesamiento de datos (SIEVART versión 0.1).

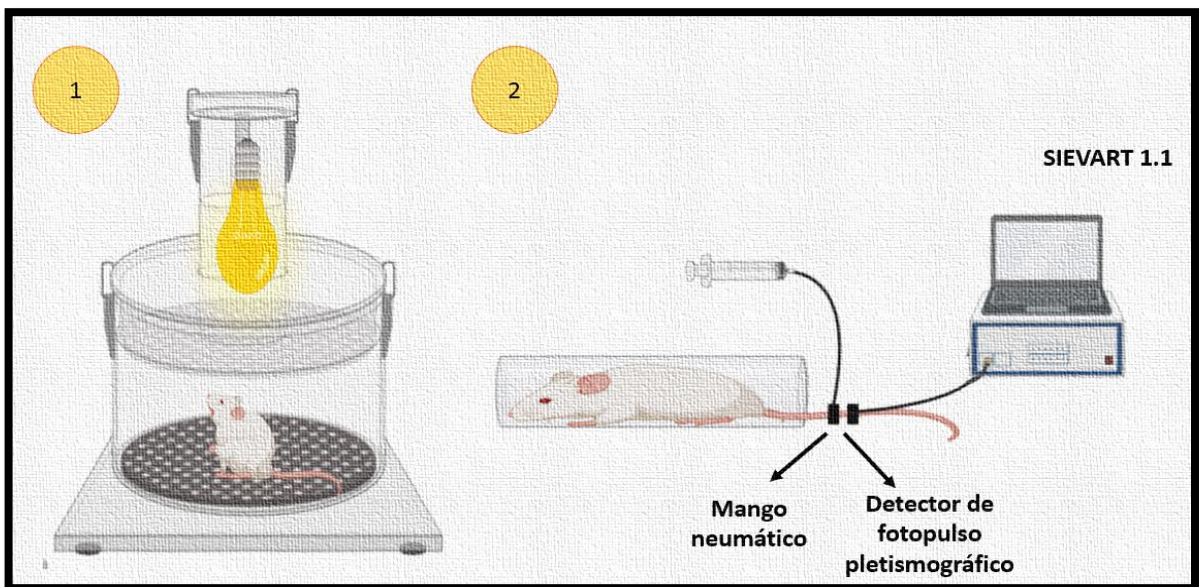


Figura 6. Determinación de la presión arterial en ratas.

### 12.4. Reactividad vascular

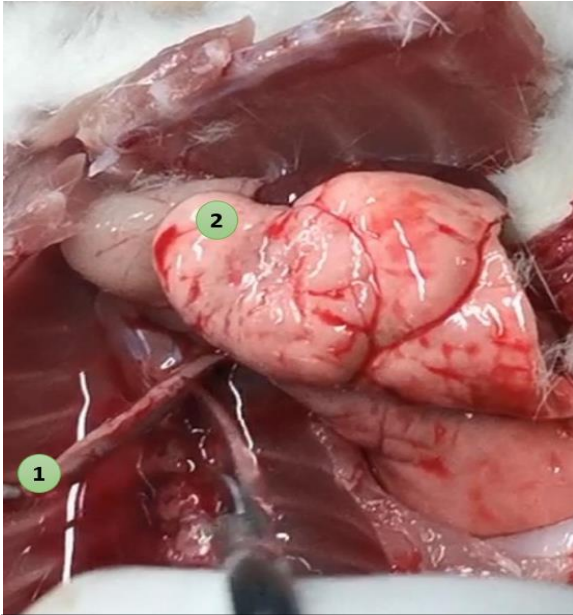
Las ratas fueron eutanasiadas por decapitación de acuerdo a lo establecido por la NOM-062-ZOO-1999. Después de la eutanasia, se realizó un corte longitudinal en



el tórax de las ratas, se localizó la aorta torácica y disecó, se colocó en una cada de Petri la cual contenía solución de Krebs. Se retiró completamente el tejido conjuntivo que rodea la aorta bajo un microscopio estereoscópico, con ayuda de instrumentos de cirugía fina. Se cuidó de no estirar la aorta para que el endotelio no sufriera daño mecánico, después se cortaron en anillos de aproximadamente 2 mm. Los anillos de la aorta se fijaron por medio de ganchos de alambre de Nicromel, al fijar los anillos se cuidó que éstos no se rasgaran para evitar un posible daño al endotelio. Por un extremo el gancho se fijó al fondo de la cámara de órgano aislado con capacidad de 5 mL y el otro extremo se fijó a un transductor de tensión conectado a un polígrafo Grass modelo 79 D con registrador. La cámara contenía solución de Krebs con la siguiente composición: (mM). 118 cloruro de sodio (NaCl), 1.2 fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 24 bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), 4.7 cloruro de potasio (KCl), 1.2 sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ), 2.5 cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 4.5 glucosa, pH 7.4, la cual permaneció con burbujeo constante de gas carbógeno (95 % de  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) y a temperatura de 37 ° C. A los anillos se les aplicó una tensión basal de 2 g. Las preparaciones se mantuvieron sumergidas en la solución de Krebs durante una hora con dos cambios de solución cada 30 minutos. Pasado este tiempo se verificó que la tensión permaneciera constante a 2 g (a esta tensión las respuestas obtenidas se registrarán por abajo del nivel de saturación). Las figuras 7 a la 10 muestran el proceso previamente descrito.

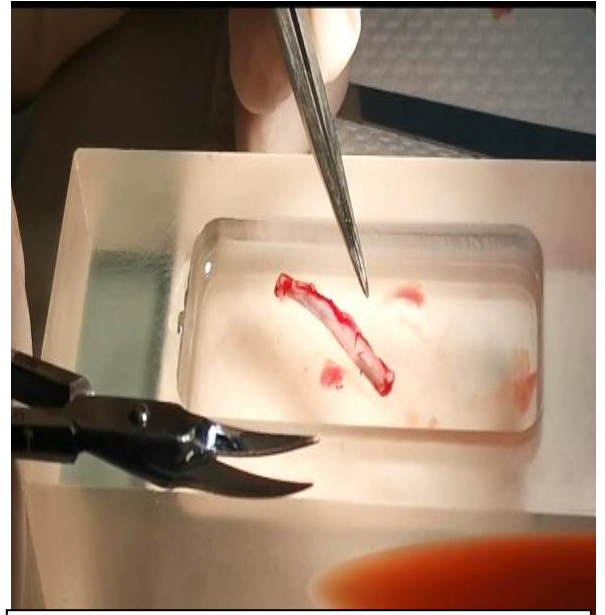




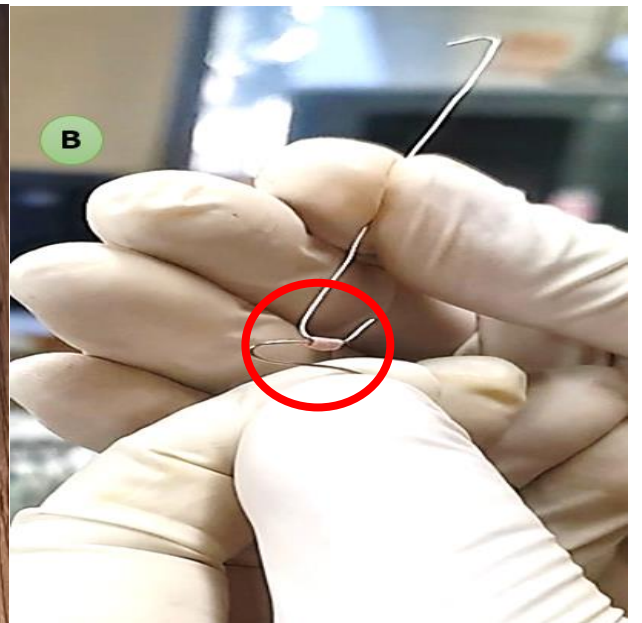


**Figura 7. Extracción de la aorta torácica.**

1. Aorta
2. Pulmones



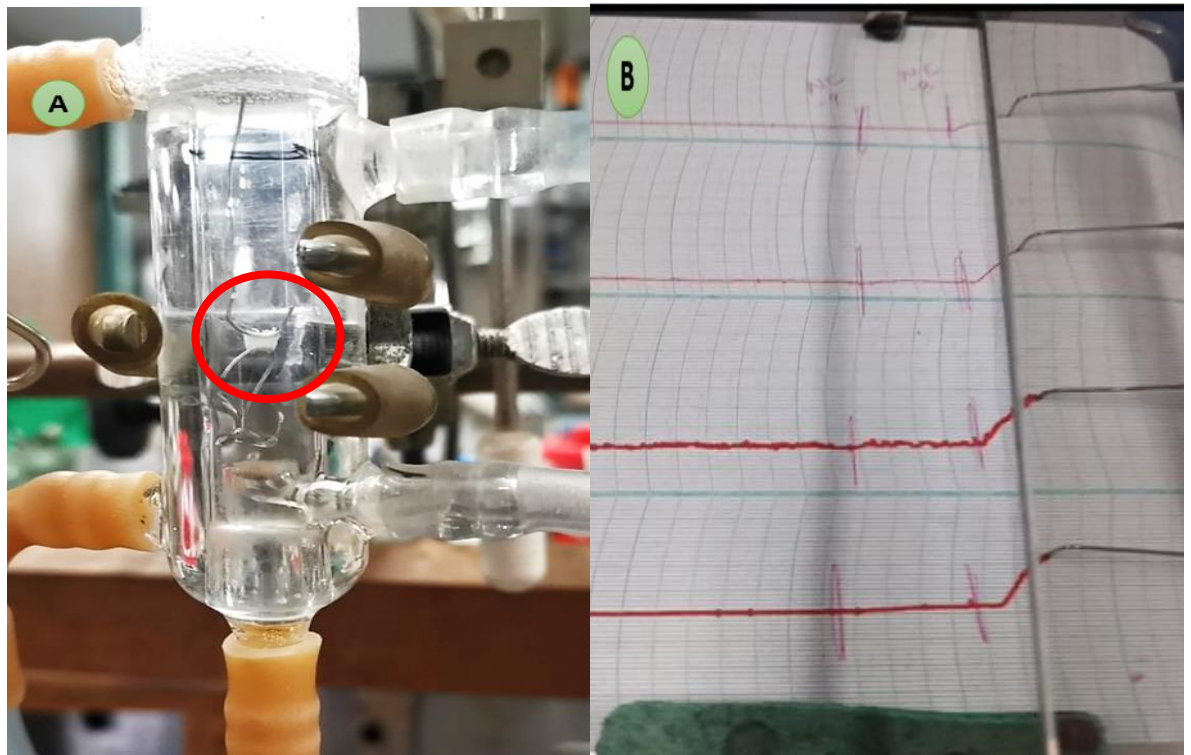
**Figura 8. Eliminación de tejido conjuntivo de la aorta torácica.**



**Figura 9 A. División de la aorta torácica en anillos.**

**Figura 9 B. Colocación de ganchos de Nicromel en los anillos de la aorta.**





**Figura 10 A. Anillo aórtico en la cámara de órgano aislado.  
Figura 10 B. Registro de la reactividad vascular.**

#### 12.4.1. Cálculo de la reactividad vascular

Dentro de la cámara para órganos aislados, se sometió a los anillos de la aorta a una tensión inicial de 2 g representado en el papel milimétrico por 20 mm utilizado en el polígrafo, para la curva de NE se consideró cuantos mm se desplaza el trazo hacia la parte superior derecha por cada concentración hasta ser asintótica con respecto a la basal, esto se va sumando hasta alcanzar la máxima respuesta para cada concentración y el resultado se reporta en g (sumatoria simple):

$$\text{Contracción (g)} = [1] + [2] + [3] + [4] + [5]$$

En el caso de ACh se procedió de la siguiente manera, dado que la concentración de NE para pre contraer los anillos de aorta es la concentración de



$2 \times 10^{-7}$  (EC50 óptima), la tensión inicial y basal es de 2 g. La respuesta máxima que se obtiene cuando el trazo se desplaza hacia la derecha en gramos indica el 100%, posteriormente se agrega de manera creciente y acumulativa la ACh de  $2 \times 10^{-9}$  a  $10 \times 10^{-5}$ , dado que, la respuesta de relajación es dependiente para cada relajación y acumulativa para la siguiente concentración se procede a realizar una ecuación de relación de linealidad y proporcionalidad.

$$\text{Relajación (\%)} = (\text{A (\%)} * (\text{B (g)} / \text{C (g)}))$$

Donde:

**A=** Máxima fuerza de contracción de la concentración de NE expresada en porcentaje

**B=** Máxima relajación obtenida por concentración expresada en gramos

**C=** Gramos de fuerza dependiente de la concentración de NE

#### **12.4.2. Curva acumulativa concentración respuesta de acetilcolina en la aorta torácica de rata**

Las curvas de concentración/respuesta a ACh se obtuvieron contrayendo los anillos inicialmente con norepinefrina (NE)  $2 \times 10^{-7}$  M y añadiendo posteriormente ACh de  $2 \times 10^{-9}$  M a  $2 \times 10^{-5}$  M, de manera consecutiva y acumulativa.

Después de obtener las curvas de relajación, los anillos de aorta se lavaron con solución de Krebs tres veces continuas y se dejaron en reposo durante 15 minutos, al finalizar este tiempo se cambió la solución nuevamente, este proceso se repitió hasta llegar al parámetro basal de cada uno de los anillos de la aorta.

#### **12.4.3. Curva acumulativa concentración respuesta de norepinefrina en la aorta torácica de rata**

Para las curvas de contracción se añadió NE a concentraciones crecientes y acumulativas;  $2 \times 10^{-9}$  M a  $2 \times 10^{-5}$  M, cuando la curva de contracción alcanzó su máxima respuesta para cada concentración, se procedió a aplicar la siguiente.



Luego de obtener las curvas de contracción, los anillos de aorta se lavaron con solución de Krebs tres veces continuas y se dejaron en reposo durante 15 minutos, al finalizar este tiempo se cambió la solución nuevamente, este proceso se repitió hasta llegar al parámetro basal de cada uno de los anillos de la aorta.

#### **12.4.4. Curvas acumulativas concentración respuesta para valorar la participación de las especies reactivas al oxígeno**

##### **Superóxido de potasio**

Los anillos de la aorta fueron incubados durante 10 minutos con superóxido de potasio ( $K_2O$ ) a concentración de  $2 \times 10^{-7}$  M después de transcurrido este tiempo la curva de relajación se realizó agregando NE  $2 \times 10^{-7}$  M, una vez que la curva de contracción llegó a su máxima respuesta se agregó ACh a concentraciones crecientes y acumulativas;  $2 \times 10^{-9}$  M a  $2 \times 10^{-5}$  M.

Para la curva de contracción, una vez que transcurrió el periodo de incubación con  $K_2O$ , se agregó NE a concentraciones crecientes y acumulativas;  $2 \times 10^{-9}$  M a  $2 \times 10^{-5}$  M, cuando la curva de contracción alcanzó su máxima respuesta de cada concentración, se procedió a aplicar la siguiente.

Después de obtener las curvas de relajación y contracción con  $K_2O$  respectivamente, los anillos de aorta se lavaron con solución de Krebs tres veces continuas y se dejaron en reposo durante 15 minutos, al finalizar este tiempo se cambió la solución nuevamente, este proceso se repitió hasta llegar al parámetro basal de cada uno de los anillos de la aorta.

##### **Peróxido de hidrógeno**

Los anillos de aorta fueron incubados durante 10 minutos con  $H_2O_2$  a concentración de  $2 \times 10^{-6}$  M después de transcurrido este tiempo la curva de relajación se realizó agregando NE  $2 \times 10^{-7}$  M, una vez que la curva de contracción llegó a su máxima respuesta se agregó ACh a concentraciones crecientes;  $2 \times 10^{-9}$  M a  $2 \times 10^{-5}$  M.





Para la curva de contracción, una vez que transcurrió el periodo de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se agregó NE a concentraciones crecientes; 2x10<sup>-9</sup> M a 2x10<sup>-5</sup> M, cuando la curva de contracción alcanzó su máxima respuesta de cada concentración, se procedió a aplicar la siguiente.

Después de obtener las curvas de relajación y contracción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente, los anillos de aorta se lavaron con solución de Krebs tres veces continuas y se dejaron en reposo durante 15 minutos, al finalizar este tiempo se cambió la solución nuevamente, este proceso se repitió hasta llegar al parámetro basal de cada uno de los anillos de la aorta.

### **12.5. Histología de los anillos aórticos**

Los anillos aórticos de cada una de las ratas se conservaron en formalina al 10% en proporción 1:20 con esta muestra se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con las técnicas tricrómica de Masson y plata metenamina Jones (JM), los cortes histológicos fueron analizados con un microscopio de luz marca Carl Zeiss modelo 6300 equipado con una cámara digital CoolSNAP-Pro de 9 megapíxeles y se analizaron por densitofotometría con el programa Sigma Scan Pro 5 ®.

### **12.6. Homogeneización de la aorta torácica**

Después de tomar los anillos aórticos, el resto del vaso se congeló en nitrógeno líquido y se homogenizó con amortiguador de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM (pH 7.0) en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 2 µM pepstatina A, 2 µM leupeptina y 0.1% de aprotinina), se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó y almacenó a -30°C. La determinación de las proteínas totales del homogeneizado se realizó según el método descrito por Bradford (Ramírez *et al.*, 2014).



### 12.6.1. Actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Esta prueba de espectrofotometría mide la generación de NADPH a partir de la NADP<sup>+</sup> como resultado de la actividad de la G6PD, midiendo la diferencia de absorbancia de la muestra durante 8 minutos (Benedikt *et al.*, 2017).

Para evaluar la actividad de la G6PD se utilizó amortiguador de TRIS-HCl (0.1 M, pH 7.5), más 2  $\mu$ L de G6P (2 mM) y 10  $\mu$ L de NADP<sup>+</sup> (5 mM). La mezcla se leyó en un espectrofotómetro (UNICO UV 2100) a 340 nm y se dejó estabilizar durante 1 min a 37°C, después de ese tiempo se adicionó 100  $\mu$ g de proteína del homogenizado de aorta y se leyó inmediatamente en un intervalo de 8 minutos (Lessmann *et al.*, 1975; Lee, 1982).

### 12.6.2. Determinación de nitritos y nitratos

El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reacciona en medios ácidos como el ácido sulfanílico (HO<sub>3</sub>SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>) para formar un catión de diazonio (HO<sub>3</sub>SC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N≡N<sup>+</sup>) que después se acopla a la amina aromática 1-naftilamina (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NH<sub>2</sub>) para producir una coloración rojo-violeta que se puede leer en el espectrofotómetro a 540 nm (Tsikas, 2007).

Para evaluar la concentración de los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se utilizó el método de la reacción de Griess (1879). Inicialmente se desproteinizaron las muestras, a 100  $\mu$ g de proteína del homogenizado de aorta se le agregaron 25  $\mu$ L de sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>) 10%, luego se agregó 25  $\mu$ L de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5 N, se homogenizó en el vórtex y se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 minutos. Después de centrifugar las muestras, se traspasa el sobrenadante a otro tubo. Se añadió a las muestras 50  $\mu$ L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14 M pH 7.35, más 5  $\mu$ L de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reductasa, luego se incubaron en baño maría a 37 °C durante 45 minutos. La curva de calibración se realizó con nitrato de sodio (NO<sub>3</sub>Na) 0.1 M en proporción 1:1000. Posteriormente, se adicionaron a todos los tubos 50  $\mu$ L de sulfanilamida al 1%, se incubaron durante 10 minutos en oscuridad. Al finalizar el tiempo de incubación, se añadió 50  $\mu$ L de 1-naftiletildiamina (NED) 0.1, el volumen total se ajustó a 1 mL y se homogenizaron



las muestras en el vórtex. La absorbancia se leyó a 540 nm (Griess, 1879; Aisa-Alvarez.*et al.*, 2020).

### **12.6.3. Determinación de la 3-nitrotirosina**

La determinación de la 3-nitrotirosina (3-NT) se realizó por ELISA (marca LifeSpanBioSciences, Seattle, WA, USA) siguiendo el método de rutina recomendado por el fabricante y se leyó a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA (Stat Fax 3200 AwarenessTechnology Palm City, FL, USA).

### **12.6.4. Concentración de glutatión**

Este ensayo consiste en la oxidación del GSH por medio del reactivo de Ellman (5,5'-Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico) para formar un cromóforo de color amarillo llamado 5'-tio-2-nitrobenzoico (TNB) el cual puede ser cuantificado por medio del espectrofotómetro, la tasa de formación de TNB es proporcional a la concentración de GSH de la muestra (Rahman *et al.*, 2006).

Para determinar la concentración del GSH, las muestras primero se desproteinizaron, ya que las proteínas intervienen con la cuantificación del GSH. A 100 µg de proteína del homogenizado de aorta se le añadieron 100 µL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M pH 7.35, más 100 µL de tungstato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) al 5% y se agregó 100 µL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , se homogenizó 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  más 100 µL de reactivo de Ellman 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 µmol/mg de proteína (Rahman *et al.*, 2006).

### **12.6.5. Determinación de selenio**

Esta prueba consiste en determinar la absorbancia del Se (IV) por medio de la digestión de la muestra empleando una mezcla de HCl:  $\text{HNO}_3$ , las moléculas orgánicas son oxidadas por la acción de los ácidos, a altas temperaturas el HCl



reduce el Se (VI) a Se (IV) y el NaOH también participa en esta reducción (Belandria *et al.*, 2011).

Para evaluar la concentración de selenio se utilizaron 200 µg de proteína del homogenizado de aorta al cual se le agregó 500 µL de la mezcla de HCl: HNO<sub>3</sub> (ácido clorhídrico: ácido nítrico, 1:4) y 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, después las muestras se incubaron a 115 °C durante 5 hrs para destruir la matriz orgánica de la muestra, cada hora se homogeneizaban en el vórtex. Posterior a ese tiempo y para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo y se le agregó 150 µL de NaOH al 0.5 N, 250 µL de formaldehído al 30%, 200 µL de sulfuro sódico al 0.1 M, 250 µL de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) al 0.01 M y 300 µL de azul de toluidina al 0.004 M. Se incubó en baño maría 15 minutos a 25 °C y posteriormente se centrifugaron las muestras durante 2 minutos a 3,500 rpm. La absorbencia se midió en el espectrofotómetro a 600 nm.

#### **12.6.6. Determinación de grupos tioles totales**

Esta prueba consiste en la reacción del reactivo de Ellman con un tiol, comúnmente tiolato, produciendo tionitrobenzoato. Para determinar la concentración de tioles libres totales se utilizó 100 µg de proteína del homogenizado de aorta al que se le añadió 100 µL de tetrahidrobórato de potasio (KBH<sub>4</sub>) disuelto en una solución de metanol: agua (1:1 v/v) 10 mM, se homogenizo en el vórtex y se dejó reposar 3 minutos. Posteriormente, se añadieron 750 µL de amortiguador pH 8.2 el cual contenía formaldehído 6.7 mM, adicionado con EDTA 10 mM y TRIS 100 mM, después se dejó reposar 3 minutos. Se agregaron 100 µL de reactivo de Ellman 10 mM. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 4 minutos y la absorbancia se leyó a 415 nm. La calibración de la curva fue realizada con GSSG y los valores fueron expresados en tioles totales (Erel and Neselioglu, 2014).

#### **12.6.7. Determinación de la tiorredoxina reductasa**

Se determinó indirectamente por la cantidad de DTNB en presencia de NADPH para formar 2 moles de TNB. La actividad de la tiorredoxina reductasa



(TrxR) se evaluó de la siguiente manera, a 100 µg de proteína del homogenizado de aorta suspendidos en 3 mL de buffer el cual contenía:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1 Mm, Ph 7.0), NADPH (0.2 Mm), EDTA (1.0 Mm) y albumina sérica bovina (0.1 mg/ 1 mL). La muestra se leyó en presencia de 20 µL del inhibidor específico de TrxR (10 µM de auranofina), junto con un duplicado de la muestra sin el inhibidor. La muestra se incubó y monitoreo a 412 nm durante 6 minutos a 37° C para monitorear la oxidación de DTNB, con un coeficiente de extinción de  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Pérez-Torres *et al.*, 2022).

#### **12.6.8. Actividad de la enzima glutatión S transferasa**

Para evaluar la actividad de la GST se utilizaron 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1M, pH 6.5) más 300 µL GSH 0.1 mM y 300 µL 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) 10 mM posteriormente se le añadieron 100 µg de proteína del homogenizado de aorta. La muestra se incubó y monitoreó a 340 nm durante 10 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.

#### **12.6.9. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa**

La actividad de la 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 utilizaron 100 µg de proteína del homogeneizado de aorta suspendidos en 2.4 mL del amortiguador de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM (ph 7.0), adicionado con NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y GR 1 UI/mL. La mezcla se leyó en el espectrofotómetro (UNICO UV 2100) a 340 nm y se dejó estabilizar durante 2 min a 37°C, después de ese tiempo se adicionó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se leyó inmediatamente en un intervalo de 8 minutos (Paglia and Valentine, 1967; Laurence and Burk, 1976; Flohé and Günzler, 1984).



#### **12.6.10. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico**

Esta prueba se basa en la reacción del malondialdehído, producto secundario de la oxidación de los AG de tres o más ligaduras con el ácido tiobarbitúrico en un medio ácido y a alta temperatura, generando un producto de coloración rosa (Gutteridge J., 1975). Para esta medición se utilizaron 100 µg de proteína del homogenizado de aorta al cual se le agregaron 50 µL de CH<sub>3</sub>OH con BHT al 4% más 1 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, se homogenizó en el vórtex durante 5 segundos, 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 una hora en baño María a 100 ° C. Después de ese tiempo y para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo y se agregó 1 mL de cloruro de potasio (KCL) al 5% por muestra se homogenizó en el vórtex durante 15 segundos después se agregaron 5 mL de n-butanol, se homogenizó en el vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 2 minutos. 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 tetraetoxipropano (Pérez-Torres *et al.* 2009).



### 13. Análisis estadístico

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa Sigma Plot (SigmaPlot ® versión 14.0, Jandel Corporation). Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. La significancia estadística se determinó con la prueba de ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey. Una  $p \leq 0.05$  se consideró como significativa.

### 14. RESULTADOS

#### 14.1. Análisis garantizado

De acuerdo a las diferentes infusiones de HSL en el **cuadro 1**, se muestran los componentes y la cantidad que aportan las infusiones a las ratas de los grupos experimentales como son: proteína, grasa, carbohidratos, antocianinas, flavonoides, polifenoles, vitamina C, ácido oleico y ácido linoleico.

Variables	HSL (%)		
	1.5	3	6
Proteína (g)	0.12	0.24	0.48
Grasa (g)	0	0	0
Carbohidratos (g)	0.61	1.23	2.46
3-glucosido de cianidina (mg/L)	105.8 $\pm$ 19.48	751.44 $\pm$ 9.64	603.94 $\pm$ 10.03
Quercetina (mg/L)	0.29 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.00	1.24 $\pm$ 0.01
Polifenoles (mM/L)	0.38 $\pm$ 0.00	0.70 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.00
Vitamina C (mM/L)	0.40 $\pm$ 0.00	0.80 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.01
Ácido oleico (%)	9.83 $\pm$ 0.86	12.11 $\pm$ 1.08	15.49 $\pm$ 1.30
Ácido linoleico (%)	2.10 $\pm$ 1.26	6.18 $\pm$ 0.21	9.32 $\pm$ 0.76

**Cuadro 1. Composición de las diferentes infusiones de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus.**



## 14.2. Analitos: Colesterol, glucosa, insulina, índice HOMA, leptina y triglicéridos

En el **cuadro 2**, se muestran las variables bioquímicas en suero de las ratas en los grupos experimentales en donde no se presentó ninguna diferencia significativa en ninguno de los grupos.

Variables	HSL (%)			
	Control	1.5	3	6
Colesterol (mg/dL)	59.4 ± 1.8	64.4 ± 3.2	56.6 ± 3.1	59.9 ± 2.7
Glucosa (mg/dL)	6.2 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.3 ± 0.1
Insulina (μU/mL)	9.1 ± 0.6	12.5 ± 2.2	11.4 ± 0.9	10.7 ± 0.9
Índice HOMA	2.5 ± 0.1	3.3 ± 0.6	3.1 ± 0.2	3 ± 0.8
Leptina (ng/mL)	8.7 ± 1.2	6.7 ± 0.6	6.1 ± 0.5	6.5 ± 0.5
Triglicéridos (mg/dL)	134 ± 18.6	130 ± 13.1	116 ± 12.9	136 ± 17.7

**Cuadro 2. Características bioquímicas en suero de las ratas experimentales con los diferentes porcentajes de infusión de *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus.**

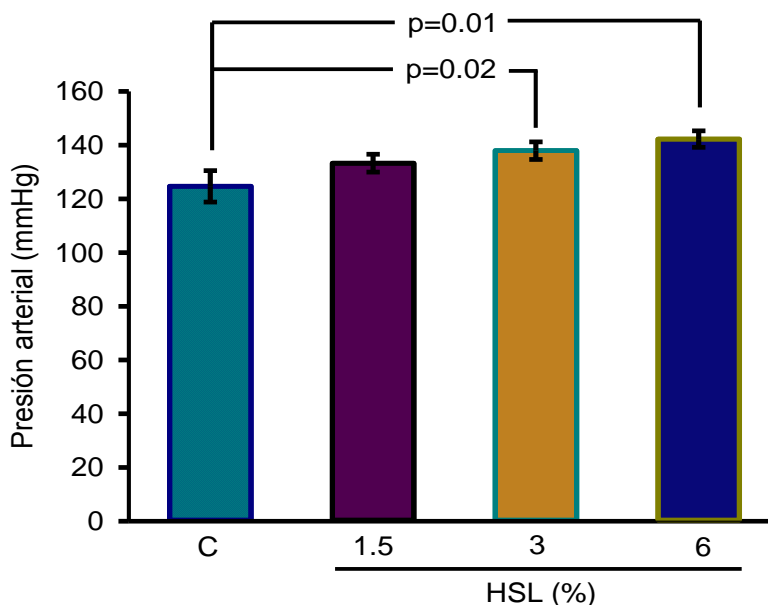
Valores expresados en media ± error estándar; (n=10).





### 14.3. Presión arterial sistólica en los grupos experimentales

En la **figura 11**, se presenta la PAS de los grupos experimentales, donde en los grupos de infusión de HSL al 3% y 6% se presentó incremento significativo ( $p=0.02$  y  $p=0.01$  respectivamente) en comparación con el grupo control.



**Figura 11.** Presión arterial sistólica en los grupos experimentales.

Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).

### 14.4. Respuesta de vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales

En la **figura 12**, se observa la respuesta a la vasodilatación en los anillos de aorta de los grupos experimentales, donde se puede observar que los grupos de 3% ( $p=0.05$ ) y 6% ( $p<0.01$ ) tienen una menor respuesta a la vasodilatación con respecto al grupo control.

En la **figura 13**, se muestra la respuesta a la vasoconstricción en los anillos de aorta de los grupos experimentales, en donde se aprecia una mayor respuesta



a la vasoconstricción en los grupos de 3% ( $p=0.03$ ) y 6% ( $p=0.001$ ) con respecto al grupo control.

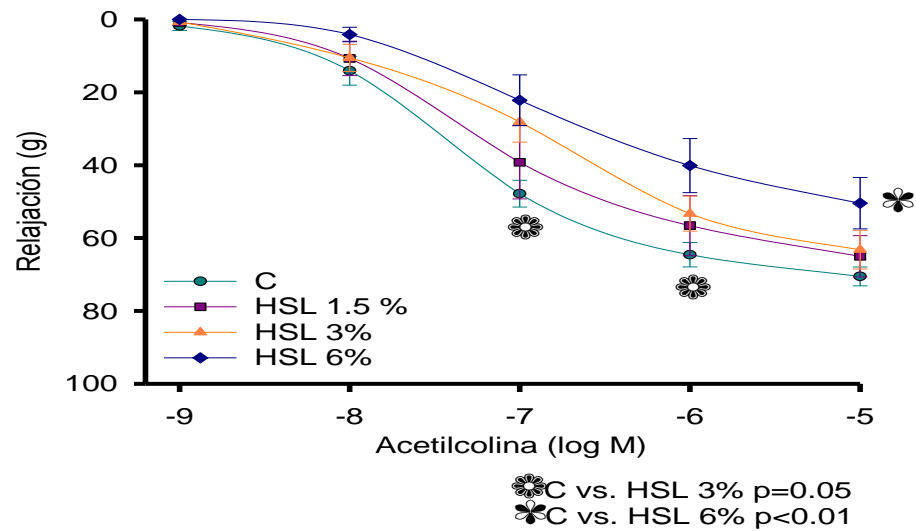


Figura 12. Vasodilatación en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.

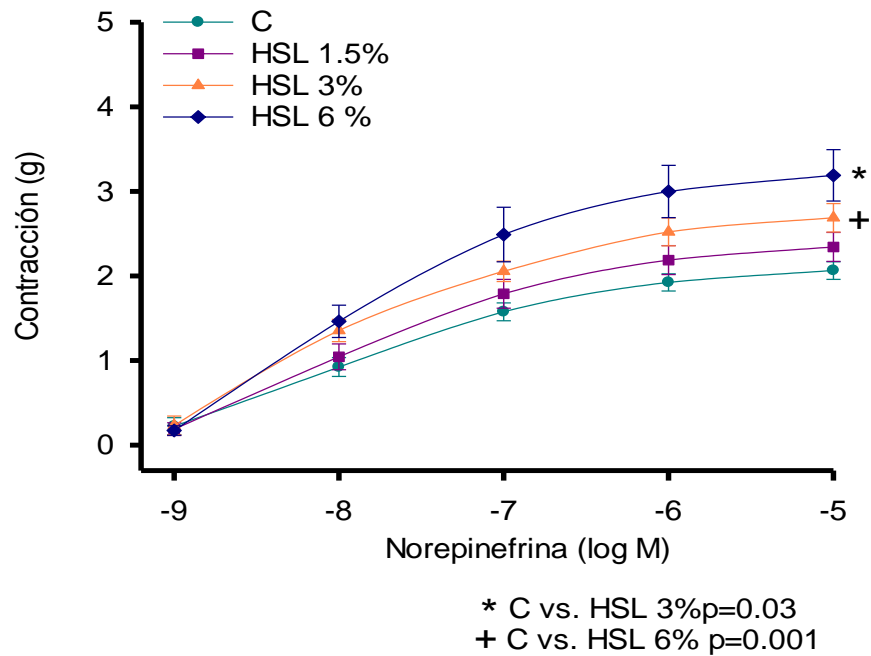
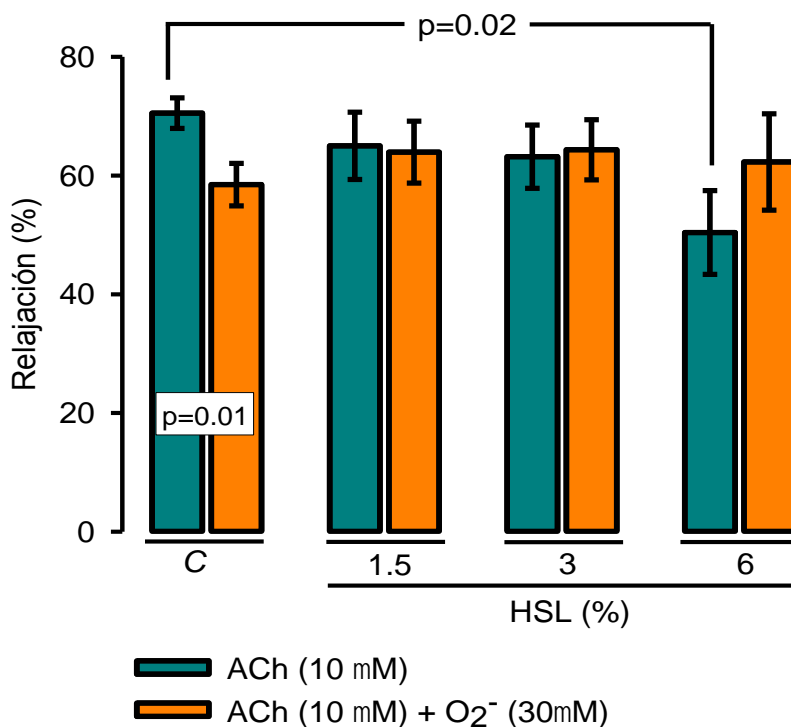


Figura 13. Vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales.

#### 14.5. Participación del superóxido sobre la respuesta de vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica

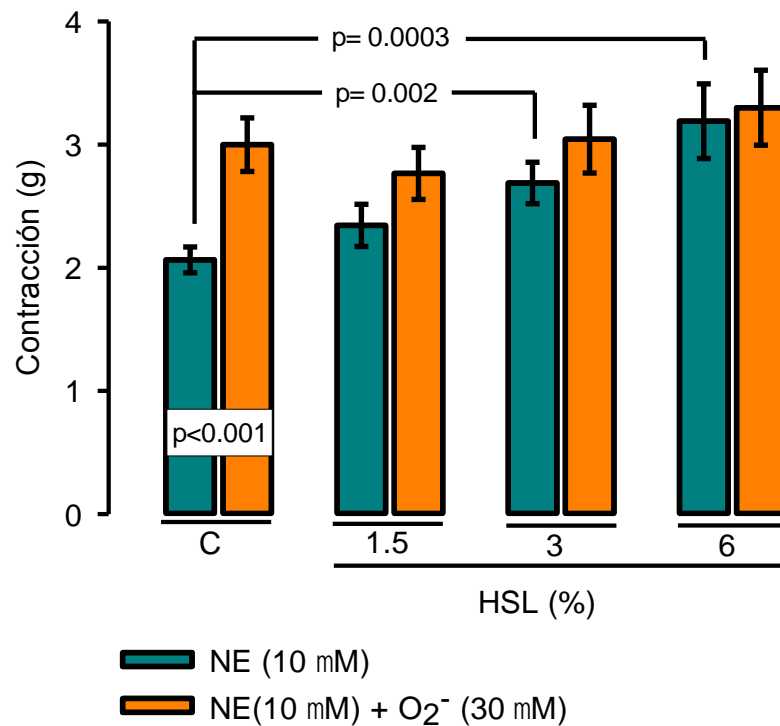
En las **figuras 14 y 15**, se muestra la participación del  $K_2O$  sobre la respuesta de vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica de los diferentes grupos experimentales. La respuesta de vasodilatación fue menor con diferencia significativa ( $p=0.01$ ) dentro del grupo control en presencia de Ach ( $10 \mu M$ ) vs. Ach ( $10 \mu M$ ) +  $K_2O$  ( $30 \mu M$ ). Esta misma tendencia se presentó en la respuesta de vasodilatación en el grupo control en presencia de Ach ( $10 \mu M$ ) vs. el grupo ratas con infusión de HSL al 6% ( $p=0.02$ ), **figura 14**.



**Figura 14.** Participación del  $K_2O$  sobre la respuesta de vasodilatación en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; ( $n=10$ ).



La **figura 15**, muestra la respuesta de vasoconstricción la cual presento incremento significativo dentro del grupo control en presencia de NE (10  $\mu$ M) vs. NE (10  $\mu$ M) + K<sub>2</sub>O (30  $\mu$ M), ( $p < 0.001$ ). Además, se observó incremento significativo en la respuesta de vasoconstricción en los anillos de aorta entre los grupos control en presencia de NE (10  $\mu$ M) + K<sub>2</sub>O (30  $\mu$ M), vs. los grupos de 3% y 6% ( $p = 0.002$  y  $p = 0.003$  respectivamente).

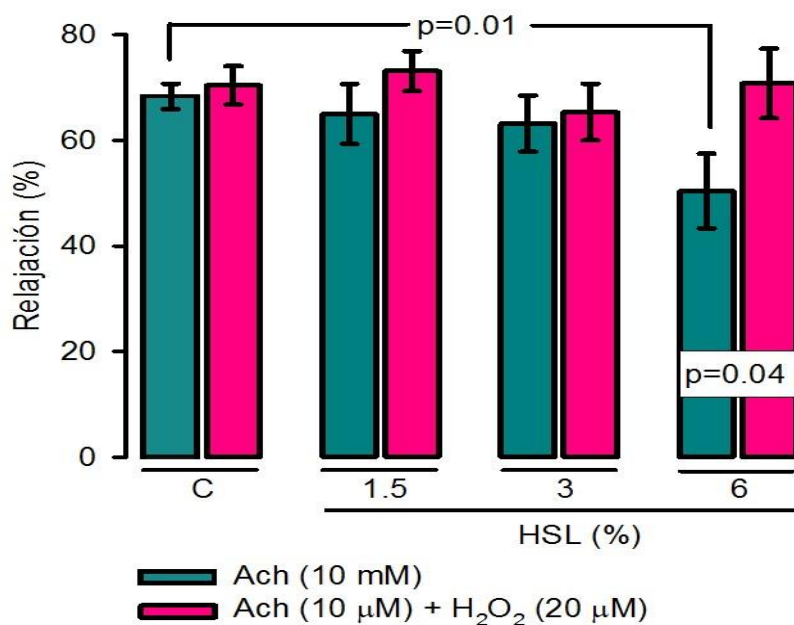


**Figura 15. Participación del K<sub>2</sub>O sobre la respuesta de vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).**



#### 14.6. Partición del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta de vasodilatación y vasoconstricción en los anillos de aorta torácica

En la **figura 16**, se presenta la participación del peróxido de hidrógeno sobre la respuesta de vasodilatación en los anillos de aorta torácica en donde esta respuesta aumento significativamente en el grupo control vs. el grupo HSL al 6% ( $p=0.01$ ). Además, al incubar con Ach ( $10 \mu\text{M}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \mu\text{M}$ ) se observó incremento significativo dentro del grupo con la infusión de HSL al 6 % vs. Ach ( $10 \mu\text{M}$ ) ( $p=0.04$ ).

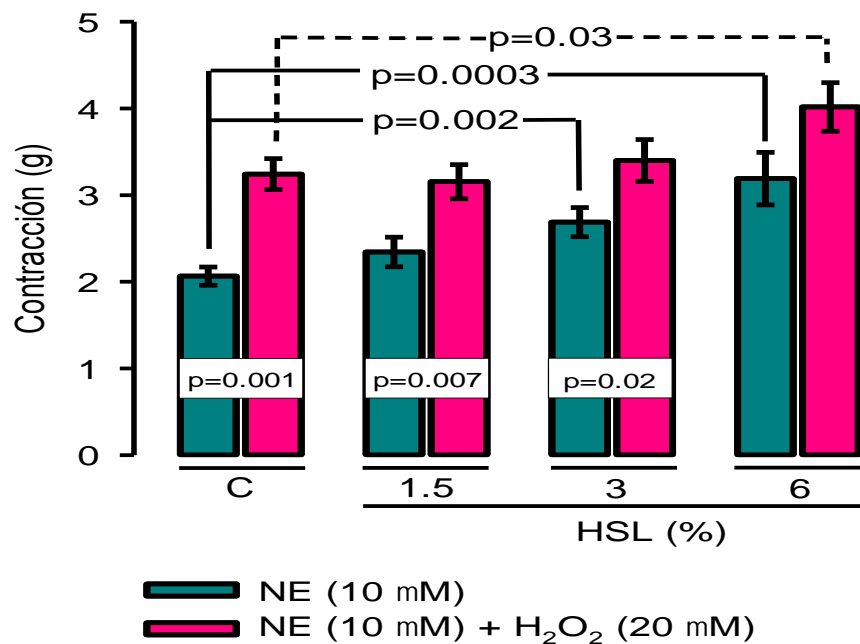


**Figura 16. Participación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la respuesta de vasodilatación en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).**

La **figura 17** corresponde a la vasoconstricción donde se muestra diferencia significativa dentro del grupo control en comparación con los grupos experimentales



con las diferentes infusiones de HSL al 1.5 %, 3 % y 6 % en presencia de NE (10  $\mu$ M) vs. NE (10  $\mu$ M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) (p=0.001, p=0.007 y p=0.02 respectivamente). Conjuntamente, se presentó incremento significativo en la respuesta de vasoconstricción en presencia de NE (10  $\mu$ M) en el grupo control vs. los grupos experimentales con la infusión de HSL al 3% y 6% (p=0.002 y p=0.0003 respectivamente). Además, se observa también incremento significativo en la respuesta de contracción en presencia de NE (10  $\mu$ M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) entre el grupo control vs. el grupo con la infusión de HSL al 6% (p=0.03).



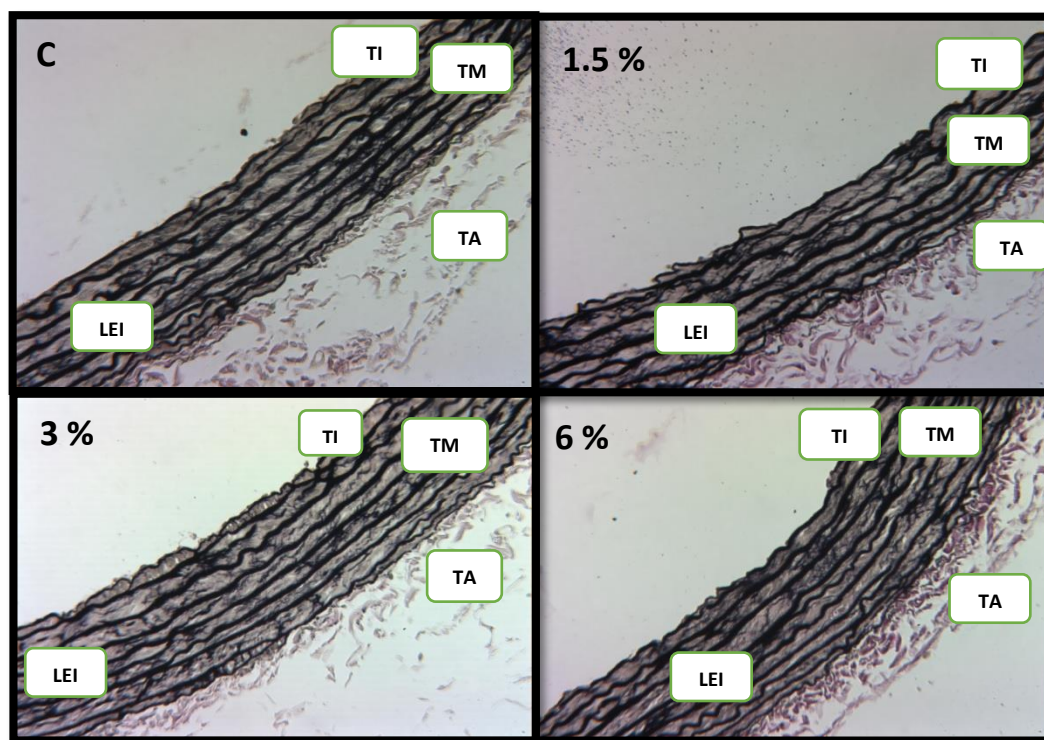
**Figura 17. Participación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la respuesta de vasoconstricción en los anillos de aorta torácica en los grupos experimentales. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).**



## 14.7. HISTOLOGÍA

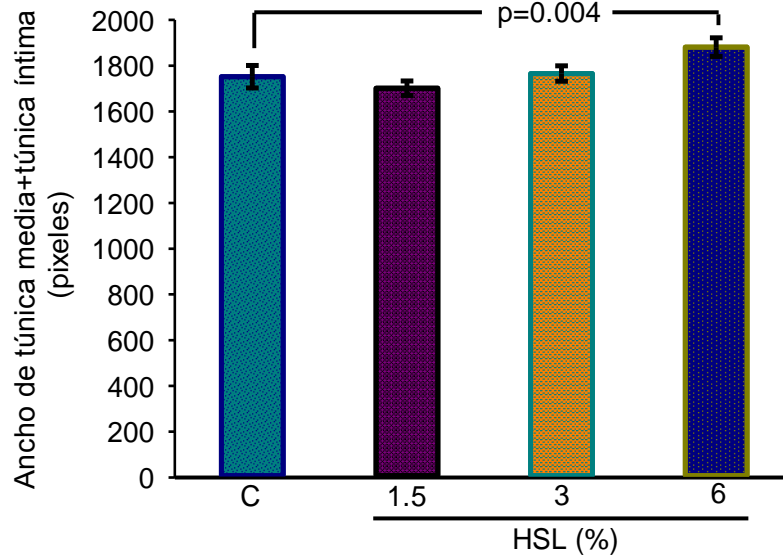
La **figura 18**, corresponde a las fotomicrografías representativas de la tinción de JM, donde se puede observar al grupo control y los grupos de HSL al 1.5, 3 y 6%, los resultados muestran que conforme se incrementa la concentración de HSL en los grupos experimentales aumenta el grosor de la pared de la aorta torácica con respecto al grupo control.

En la **figura 19**, se muestra el análisis densitofotométrico del grosor de las fibras elásticas en los diferentes grupos experimentales, en donde se presentó menor grosor en el grupo control con diferencia significativa en comparación con el grupo de HSL al 6% ( $p=0.04$ ). Los otros grupos con infusión de HSL al 1.5% y 3% no mostraron diferencia en comparación con el grupo control.



**Figura 18.** Fotomicrografías representativas que muestran las fibras elásticas en la pared de la aorta torácica de los diferentes grupos experimentales. Tinción de JM. Abreviaturas: TI=Túnica íntima, LEI=Lamina elástica interna, TM=Túnica media, TA=Túnica adventicia.





**Figura 19. Análisis densitofotométrico del grosor de las fibras elásticas de la aorta torácica. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).**

La **figura 20**, corresponde a las fotomicrografías representativas de la tinción Tricrómica de Masson, en el grupo control y los grupos de HSL al 1.5, 3 y 6% los resultados mostraron que conforme aumenta la concentración de infusión de la HSL en los grupos experimentales respectivamente, aumentó el grosor de la pared de la aorta torácica con respecto al grupo control.

En la **figura 21**, se presenta el análisis densitofotométrico del grosor de la pared de la aorta torácica de los diferentes grupos experimentales, donde se presentó engrosamiento de la pared de la aorta con diferencia significativa ( $p=0.02$ ) entre el grupo de 6% con respecto al control. Los otros grupos con infusión de HSL al 1.5% y 3% no mostraron diferencia.





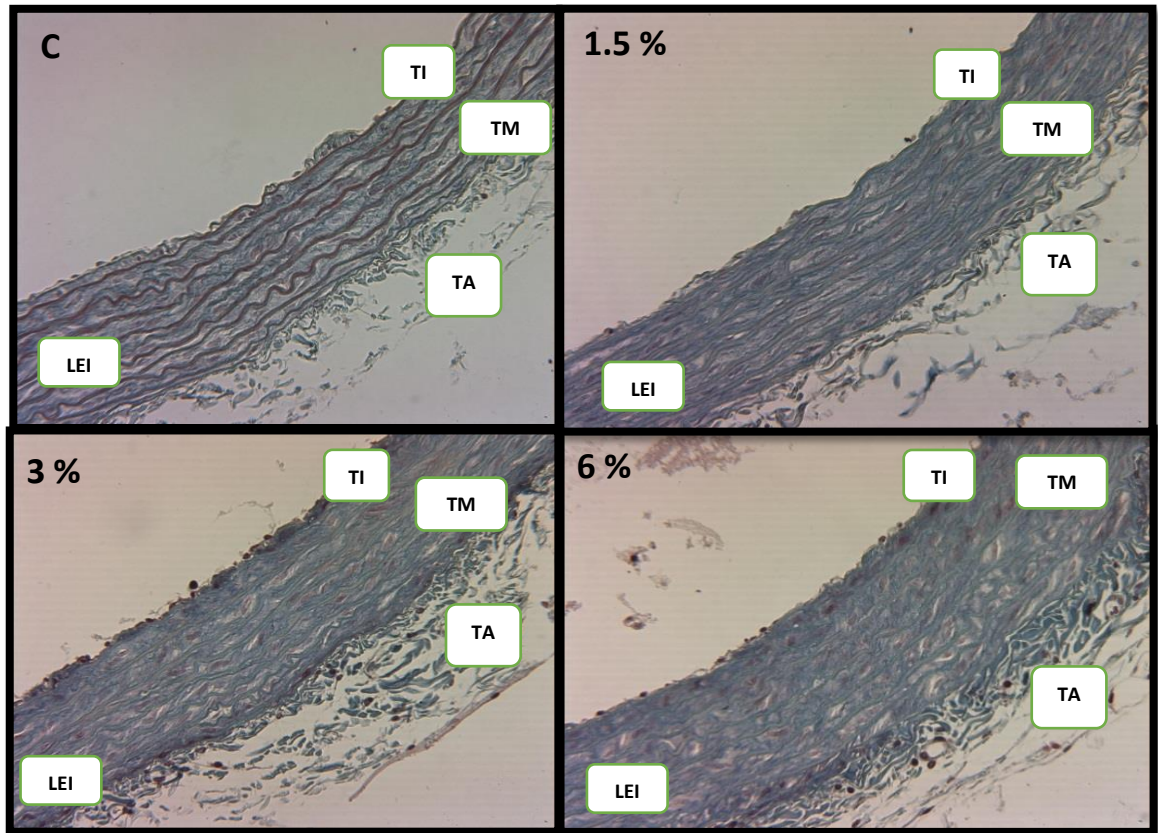


Figura 20. Fotomicrografías representativas que muestran la pared de la aorta torácica de los diferentes grupos experimentales. Tinción Tricrómica de Masson, tomadas con filtro azul 20X, monocromático. Abreviaturas: TI=Túnica íntima, LEI=Lamina elástica interna, TM=Túnica media, TA=Túnica adventicia.

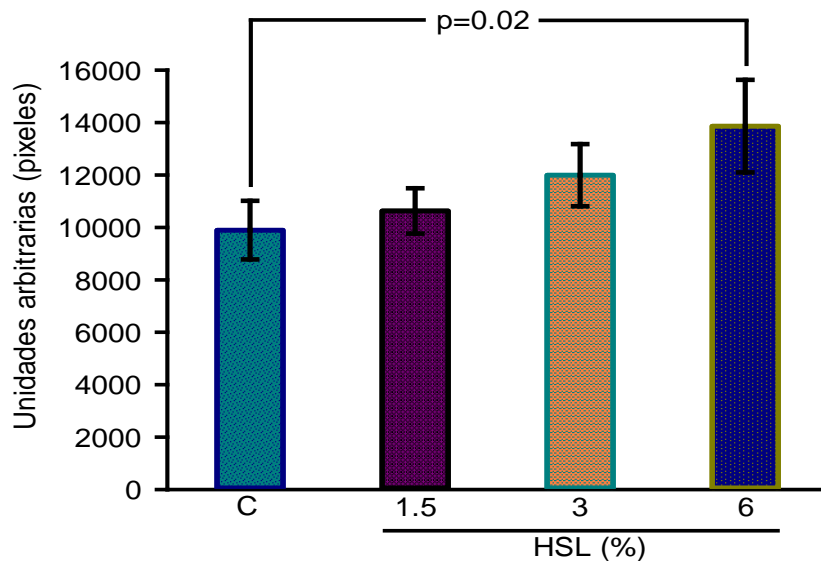


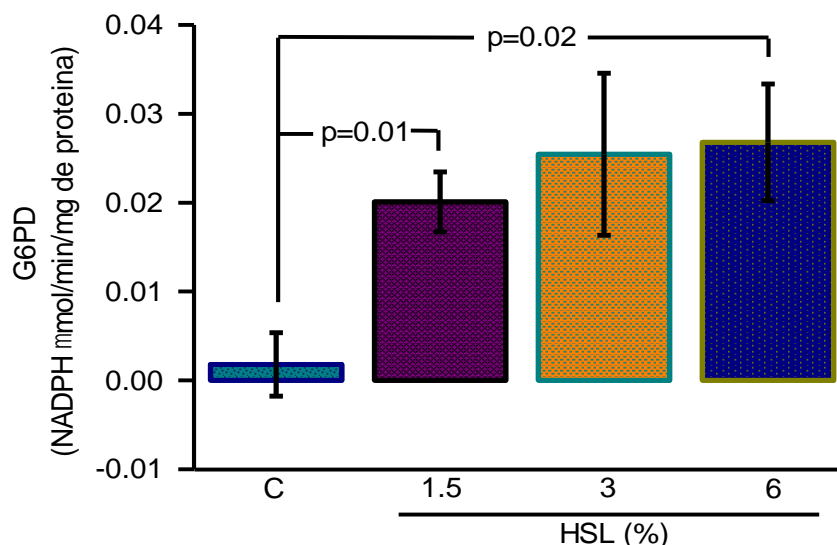
Figura 21. Análisis densitofotométrico del grosor de la pared de la aorta torácica. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).



## 14.8. Sistemas antioxidantes

### 14.8.1. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

En la **figura 22**, se observa la concentración de la G6PD en el homogeneizado de aorta torácica en donde se puede apreciar incremento significativo en el grupo de HSL al 1.5 % y al 6 % con respecto al grupo control ( $p=0.01$  y  $p=0.02$  respectivamente).

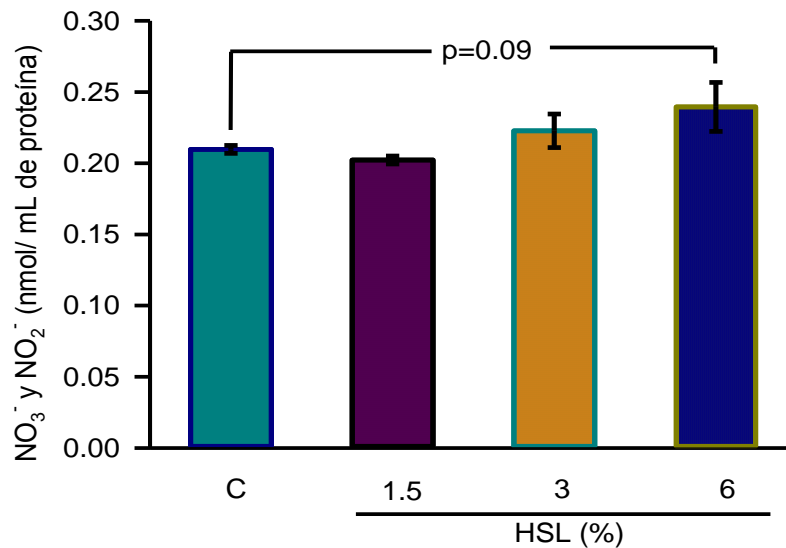


**Figura 22.** Concentración en la aorta torácica del G6PD con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).

### 14.8.2. Nitritos y nitratos

En la **figura 23**, se presenta la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en el homogeneizado de aorta torácica donde se observó tendencia a incrementarse conforme aumenta la concentración de los grupos experimentales de HSL respecto al grupo control, pero sin diferencia significativa ( $p=0.09$ ).

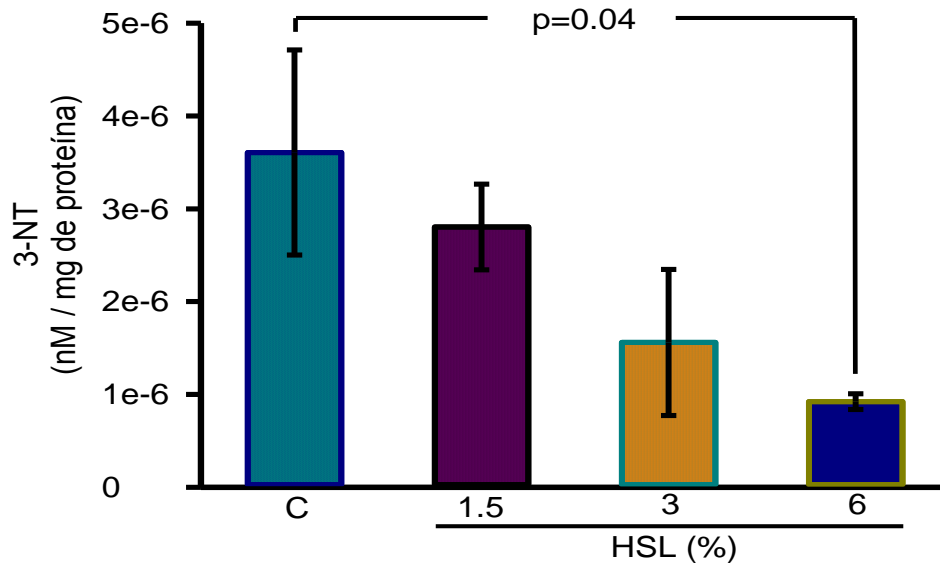




**Figura 23.** Concentración en la aorta torácica de los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media ± error estándar; (n=10).

### 14.8.3. 3- Nitrotirosina

En la **figura 24**, se observa la concentración de la 3-NT en el homogeneizado de aorta torácica donde se puede apreciar disminución significativa en el grupo de HSL al 6% con respecto al grupo control (p=0.04).

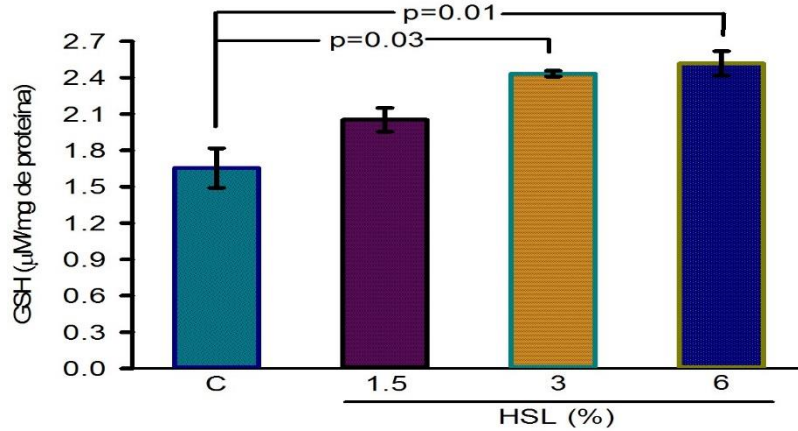


**Figura 24.** Concentración en la aorta torácica de la 3-nitrotirosina con diferentes porcentajes de infusión de HSL.



#### 14.8.4. Glutación

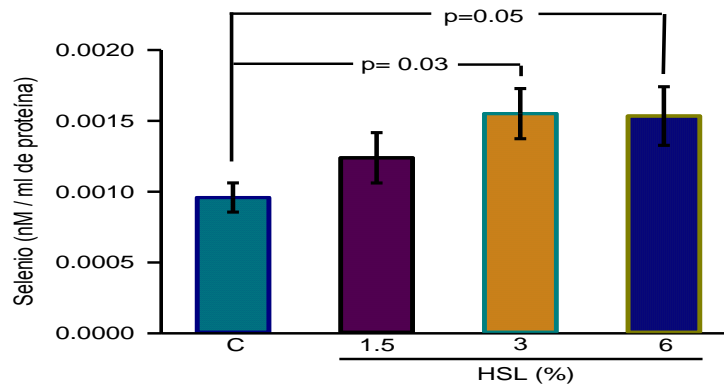
En la **figura 25**, se muestra la concentración del GSH en el homogeneizado de aorta torácica donde se observó incremento significativo en el grupo de HSL al 3 % y 6 % con respecto al grupo control ( $p=0.03$  y  $p=0.01$  respectivamente).



**Figura 25.** Concentración en la aorta torácica del GSH con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).

#### 14.8.5. Selenio

En la **figura 26**, se aprecia la concentración de Se en el homogeneizado de aorta torácica donde se observó incremento significativo en los grupos de 3% ( $p=0.03$ ) y 6% ( $p=0.05$ ) de HSL con respecto al grupo control.

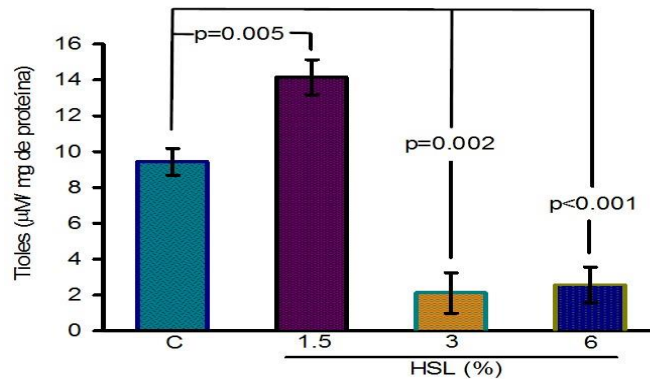


**Figura 26.** Concentración en la aorta torácica de Se con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).



### 14.8.6. Tioles

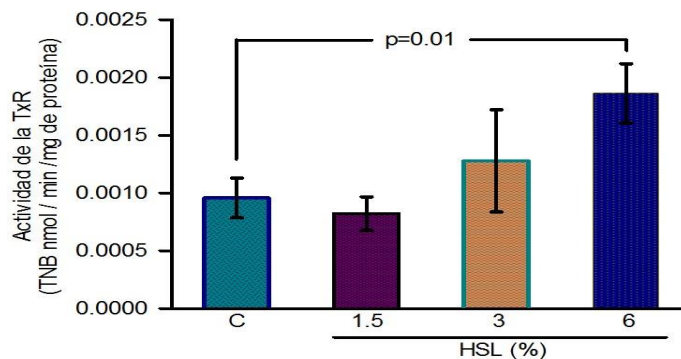
En la **figura 27**, se observa la concentración de los tioles totales en el homogeneizado de aorta torácica donde se puede apreciar incremento significativo en el grupo de 1.5 % con respecto al grupo control ( $p=0.005$ ), mientras que, en los grupos de 3 % y 6 % se puede apreciar disminución significativa con respecto al grupo control ( $p=0.002$  y  $p<0.001$  respectivamente).



**Figura 27.** Concentración en la aorta torácica de tioles totales con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).

### 14.8.7. Actividad de la tioredoxina reductasa

En la **figura 28**, se presenta la actividad de la TrxR en el homogeneizado de aorta torácica en donde se observó incremento significativo en el grupo de 6% de HSL ( $p=0.01$ ) con respecto al grupo control.



**Figura 28.** Actividad enzimática de la TrxR con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).



#### 14.8.8. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

En la **figura 29**, se puede observar la actividad de la GPx en el homogeneizado de aorta torácica en donde se puede apreciar incremento significativo del grupo de HSL con respecto al grupo control ( $p=0.03$ ).

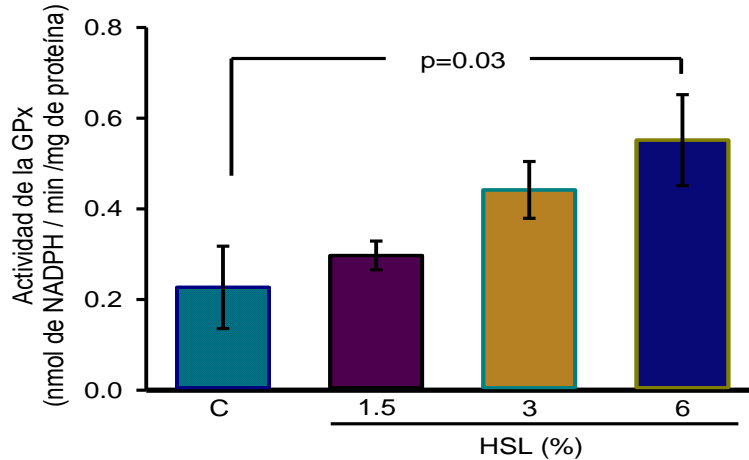


Figura 29. Actividad enzimática de la GPx con diferentes porcentajes de infusión de HSL.

#### 14.8.9. Actividad enzimática de la glutatión S transferasa

En la **figura 30**, se muestra la actividad de la GST la cual presentó disminución en la actividad con diferencia significativa en el grupo de HSL al 3% y 6% con respecto al grupo control ( $p=0.0009$  y  $p=0.0005$  respectivamente).

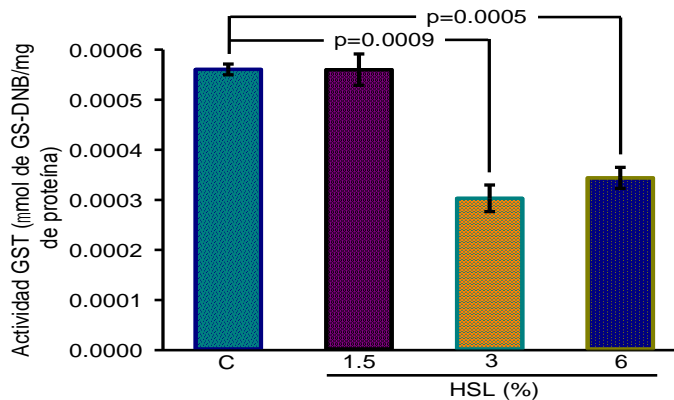
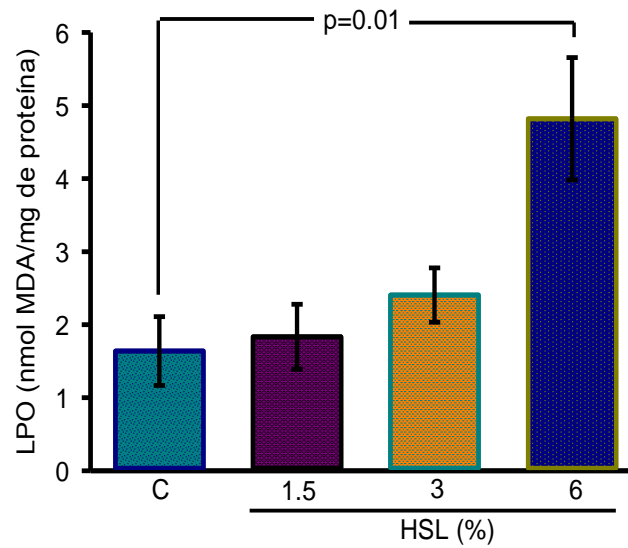


Figura 30. Actividad enzimática de la GST en la aorta torácica con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).



### 14.8.10. Lipoperoxidación

En la **figura 31**, se presenta el índice de lipoperoxidación, en donde se observó incremento significativo en el grupo de HSL al 6% con respecto al grupo control ( $p=0.01$ ).



**Figura 31.** LPO en la aorta torácica con diferentes porcentajes de infusión de HSL. Valores expresados en media  $\pm$  error estándar; (n=10).



## 15. DISCUSIÓN

El equilibrio redox es fundamental para mantener la homeostasis del organismo entre los ROS y los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, el ER es un concepto que actualmente no está bien definido. Sin embargo, al igual que el EO el ER genera efectos perjudiciales (Bellezza *et al.*, 2018). En diversos estudios se ha observado incremento de equivalentes reductores y de los sistemas antioxidantes, no obstante, los mecanismos de acción, las consecuencias biológicas, así como la respuesta de la célula ante estos cambios siguen siendo desconocidos. Tradicionalmente se asocia un ambiente reductor con efectos benéficos para las funciones celulares y los procesos biológicos. Sin embargo, el incremento de estos componentes de manera prolongada puede perturbar el equilibrio redox y generar efectos nocivos como interferir en la señalización y síntesis de los ROS (Xiao and Loscalzo, 2020).

El objetivo de este estudio fue evaluar la modulación de la reactividad vascular por ER asociado al consumo excesivo de diferentes porcentajes de infusión de HSL.

En este sentido, la HSL es considerada un alimento “funcional” es decir, proporciona diversos componentes con actividad biológica, por ejemplo, puede proveer diferentes minerales y aminoácidos esenciales para los sistemas antioxidantes. Sin embargo, estas características “benéficas” podrían tornarse perjudiciales si se consumen en exceso o por un periodo prolongado de tiempo, incrementando la enzimas antioxidantes y equivalentes reductores que podrían conducir a ER y al desequilibrio redox (Ariza *et al.*, 2017). Como se puede observar en el **cuadro 2**, las diferentes infusiones de HSL no tienen injerencia sobre las variables bioquímicas determinadas.

Sin embargo, los resultados del presente estudio muestran incremento significativo en el tamaño de las fibras elásticas de la aorta torácica observando que: a mayor porcentaje de infusión de HSL, mayor grosor de las fibras elásticas e





hipertrofia de la pared vascular, presentadas en las fotomicrografías representativas y en el análisis densitofotométrico de la histología (**Figuras 18-21**). Lo mencionado anteriormente se reflejó en la presión arterial de los grupos experimentales con infusión de HSL al 3 y 6 % con respecto al grupo control, en donde podemos observar un incremento significativo (**Figura 11**  $p=0.02$  y  $p=0.01$  respectivamente). Cuando se generan alteraciones estructurales como la hipertrofia de la pared en arterias conductoras, generalmente se asocian con rigidez e incremento de la presión arterial (Berillis, 2013). Un estudio llevado a cabo en ratas macho “Carworth”, asoció el incremento de los depósitos de colágeno y fibras elásticas en la arteria renal con la presencia de hipertensión renovascular (Wolinsky, 1972). Este mismo efecto se observó en otro estudio al analizar la estructura de la aorta en ratas “Wistar” hipertensas, en donde la hipertrofia provocada en la pared de este vaso sanguíneo repercutió en la disminución de la elasticidad de las fibras elásticas y biosíntesis de colágeno lo que resultó en el aumento de la presión arterial (Ooshima *et al.*, 1974; Berillis, 2013). Además, se ha descrito que, la hipertrofia de la pared de la aorta puede estimular al sistema renina-angiotensina, la angiotensina II produce vasoconstricción generalizada además de favorecer la producción  $O_2^-$  por medio de la activación del sistema oxidativo de membrana NADH / NAD(P)H en las células musculares lisas, lo que conlleva a la inactivación de la eNOS provocando a su vez, la oxidación de la tetrahidrobiopterina que actúa como cofactor para la síntesis de NO (González *et al.*, 2004). Asimismo, se debe considerar que los grupos de 3% y 6% de HSL podrían tener exceso de tirosina aminoácido proporcionado por la misma planta, lo que llevaría a proporcionar un exceso de sustrato para la síntesis de noradrenalina, por parte de las terminaciones nerviosas simpáticas lo que podría contribuir al aumento de la presión arterial (Olmos, 2010; Semsri *et al.*, 2020).

Nuestros resultados muestran que la vasoconstricción en la aorta de las ratas tratadas con infusión de HSL al 3% y 6%, aumentó significativamente (**Figura 13**  $p=0.03$  y  $p=0.001$  respectivamente) y la vasodilatación disminuyó (**Figura 12**  $p=0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente), esto sugiere que el incremento de antioxidantes aportados



por la infusión de HSL puede modular la reactividad vascular a través de la disminución de la eNOS y esto podría influir sobre el engrosamiento de las fibras elásticas, la zona media muscular y la pérdida de la elasticidad en la aorta torácica.

De igual manera, en las células endoteliales es indispensable mantener el equilibrio redox, ya que la producción excesiva o la disminución de los ROS puede contribuir a la alteración de la función vascular y por consiguiente conducir a diversas enfermedades vasculares (Taverne *et al.*, 2013). Los efectos de los ROS en el sistema cardiovascular no son uniformes, ya que dependen de que molécula de ROS esté actuando y a que concentración (Bretón and Lamas, 2014). En el sistema cardiovascular los ROS más importantes son el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$ , el NOy el  $ONOO^-$  (Touyz *et al.*, 2020).

El exceso de antioxidantes y de precursores utilizados por los sistemas antioxidantes proporcionadas por las infusiones de HSL podría estar disminuyendo la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  que en concentraciones fisiológicas actúan como segundos mensajeros. Altas concentraciones de  $O_2^-$  pueden favorecer la vasoconstricción debido a que reduce la biodisponibilidad de NO al reaccionar con la misma y generar  $ONOO^-$  (Bretón and Lamas, 2014). En nuestro estudio, la respuesta de vasoconstricción con diferentes porcentajes de infusión de HSL eliminó la diferencia significativa que presentó el grupo control (**Figura 15**  $p < 0.001$ ) tras ser incubado con  $K_2O$ . El  $K_2O$  reacciona violentamente con el agua para formar KOH y, en este proceso, se forma el  $O_2^-$ , lo cual sugiere la participación del  $O_2^-$  en la respuesta vascular, pero también muestra que el exceso de HSL disminuye la concentración  $O_2^-$  este resultado se puede asociar a la alteración de la reactividad vascular y al aumento de la PAS.

En contraste, el  $H_2O_2$  favorece la vasodilatación y produce NO a través de la activación de diferentes vías de señalización como PI3K/ Akt, Erk1/2 y p38MAPK (Touyz *et al.*, 2020). Recientemente se ha descrito que el  $H_2O_2$  no solo estimula la eNOS, sino que también puede aumentar su expresión. Otra proteína que participa en la regulación de la vasodilatación es la PKG1 $\alpha$ , esta proteína quinasa es sensible



a la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la formación de un enlace disulfuro y la vasodilatación que se produce es independiente a los niveles de cGMP (Bretón and Lamas, 2014). Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que la vasodilatación aumenta posterior a la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en todos los grupos experimentales, observando así la participación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la respuesta de vasodilatación, pero también sugiere que el exceso de antioxidantes proporcionados por la infusión de HSL al 6 % disminuye la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lo que se refleja en la alteración de la función arterial probablemente atribuido a la disminución de la vía de la eNOS. En este sentido, la tendencia y el aumento de la relación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  en los grupos que consumieron la infusión de HSL al 3 % y 6 % podría reflejar indirectamente la sobreexpresión/actividad de la iNOS (**Figura 23**  $p=0.09$ ).

Asimismo, algunas especies reactivas al nitrógeno (RNS) como  $\text{ONOO}^-$  exacerbaban los procesos inflamatorios y junto con mayor disponibilidad del NO por la vía de la iNOS son la principal característica del daño endotelial (Pérez-Torres *et al.*, 2020; Handy *et al.*, 2021). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la relación  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  presentaba tendencia a aumentar, pero la 3-NT estaba disminuida (**Figura 24**). Estos resultados podrían ser paradójicos porque se esperaba aumento en de la nitrosilación de las proteínas; a través de la vía metabólica de la iNOS que probablemente estaría aumentada en la aorta. No obstante, el exceso de antioxidantes proporcionado por la infusión de HSL al 6 % podría disminuir el  $\text{ONOO}^-$  que participa en el proceso de nitrosilación explicando así la disminución significativa de la 3-NT del homogeneizado aórtico en este grupo ( $p=0.04$ ). Esta disminución también se asocia a la baja concentración de los grupos tiol en las cisteínas de las proteínas en los grupos experimentales por el consumo excesivo de HSL al 1.5, 3 y 6 % (**Figura 27**  $p=0.005$ ,  $p=0.02$  y  $p<0.001$ , respectivamente), (Pérez-Torres *et al.*, 2020). Sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta hipótesis.

Por otro lado, la enzima antioxidante G6PD presente en el endotelio se encarga de proporcionar equivalentes reductores como el NADPH y controlar la producción ROS (Leopold *et al.*, 2003). En un estudio se observó que la sobreexpresión de la



G6PD disminuyó el exceso de ROS en las células endoteliales tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ); además la sobreexpresión de la G6PD mantuvo elevado la concentración de GSH a través de la vía de la GR (Leopold *et al.*, 2003). En células vasculares se ha observado que algunos procesos que generan inflamación como la hipertrofia de la pared vascular en el SM y en la diabetes tipo 2, podrían incrementar la expresión de la G6PD y favorecer niveles elevados de NADPH como mecanismo compensatorio (Peiró *et al.*, 2016). Se ha reportado que el tratamiento de células vasculares con 1L-1 $\beta$  provoca inflamación y en consecuencia se activa la NADPH oxidasa necesaria para la producción de ROS, paralelamente este proceso incrementó las concentraciones de GSH (Peiró *et al.*, 2016). En nuestro estudio podemos observar el incremento de la G6PD en el homogeneizado de aorta, siendo significativo en los grupos de 1.5% y de 6% (**Figura 22**, p=0.01 y p=0.02 respectivamente), estos resultados podrían atribuirse a la alteración de la función vascular y a los cambios estructurales asociados al nivel de inflamación e hipertrofia de la pared de la aorta, ya que como se mencionó anteriormente, la hipertrofia provoca la activación de la NADPH oxidasa y de algunas interleucinas que favorecen la presentación de un ambiente de inflamación, estos procesos pueden estimular la activación de la G6PD para ejercer su efecto *per se* como antioxidante y al mismo tiempo, generando equivalentes reductores que les servirán a otras enzimas antioxidantes como a la GPx, TrxR e iNOS. Conjuntamente, la HSL puede favorecer el incremento de la actividad de la G6PD como se ha observado en algunos estudios previos, por lo que a mayor porcentaje de infusión HSL mayor la actividad o expresión de esta enzima lo que conduce al aumento de la NADPH (Ajiboye *et al.*, 2016). Sin embargo, son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

Además, el incremento en la actividad de la G6PD puede favorecer también el aumento en las concentraciones de GSH, la HSL puede contribuir por sí misma a aumentar el GSH ya que contiene cisteína, glicina y ácido glutámico precursores del GSH, que podrían aumentar la síntesis de este antioxidante (Ariza *et al.*, 2017). En este sentido, nuestros resultados mostraron incremento significativo en la



concentración del GSH en los grupos que recibieron la infusión al 3% y 6% de HSL (**Figura 25**  $p=0.03$  y  $p=0.01$ , respectivamente).

La HSL en diferentes concentraciones también puede aportar Se y la cantidad aportada depende del cultivo, tipo de suelo, pH, tipo de especie vegetal (Hariharan and Dharmaraj, 2020; White, 2016). El Se es considerado un micronutriente esencial, su exceso o disminución en el organismo favorece la aparición de algunas enfermedades como hipotiroidismo, alteraciones cardiovasculares, deterioro cognitivo, debilitamiento del sistema inmunológico, entre otras (White, 2016). Además, el Se es indispensable para 25 selenoenzimas como la GPx y la TrxR, que contribuyen a mantener la homeostasis redox (Lee and Jeong, 2012). En nuestros resultados observamos que a mayor porcentaje de infusión de HSL existe incremento significativo de Se como se observa en la **Figura 26**, lo cual sugiere que el consumo excesivo de HSL podría generar selenosis, la cual es provocada por la ingesta excesiva de Se. Sin embargo, se necesitan más estudios para corroborar esta hipótesis.

El Se puede ser oxidado en presencia de especies nitrogenadas y de GSH (Terada *et al.*, 1999). En este sentido, los compuestos de Se como el selenito y el dióxido de selenio pueden reaccionar con los grupos tiol, presentes en el GSH para producir  $O_2^-$ , esto se ha observado en experimentos con mitocondrias aisladas tratadas con componentes que tienen Se, incluyendo selenito y selenocisteína (Lee and Jeong, 2012). Esto sugiere que el exceso de Se podría conducir a la generación de  $O_2^-$  y  $ONOO^-$  y el exceso de antioxidantes proporcionados por la HSL puede disminuirlos. En algunos estudios se ha observado que el nivel elevado en la concentración de Se favorecen la LPO (**Figura 31**), provocan daño al DNA, favorecen la degradación de algunas proteínas y la degradación de ácidos grasos poliinsaturados (Lee and Jeong, 2012).

La concentración Se podría causar la oxidación de los tioles (**Figura 27**). Nuestros resultados mostraron que la concentración de tioles totales estaba disminuida



significativamente en el grupo de 3% ( $p=0.002$ ) y 6% ( $p<0.001$ ) pero la LPO estaba aumentada. Los bajos niveles de tioles pueden contribuir a la alteración de la función vascular y a los cambios estructurales de la aorta torácica en estos grupos de ratas y estar relacionados con eventos cardiovasculares (Bourgonje *et al.*, 2021). Otro estudio asoció la disminución de los tioles y el aumento en la LPO con la gravedad de las lesiones de la enfermedad coronaria arterial (Ahmed *et al.*, 2018). Para mantener la homeostasis de los tioles en las cisteínas de las proteínas, las células de los mamíferos dependen del sistema de TrxR (Lu and Holmgren, 2014; Hariharan and Dharmaraj, 2020). Este sistema contribuye a la regulación del tono vascular, ya que la inhibición de estas enzimas por medio de algunos fármacos aumenta la producción de  $H_2O_2$  e inhiben a la sGC lo que altera la respuesta dependiente del endotelio al disminuir la vasorelajación por medio del NO (Handy *et al.*, 2021). Un estudio en ratones demostró que la delección de la TrxR 2, generó una menor respuesta a la vasodilatación y una mayor producción de  $ONOO^-$  lo cual favoreció la vasoconstricción (Kirsch *et al.*, 2016; Kameritsch *et al.*, 2021). Los resultados en el presente estudio muestran incremento significativo en el grupo de 6% (**Figura 28**  $p=0.01$ ) en la actividad de esta enzima. Estos resultados sugieren que el incremento en la actividad de la TrxR podría atribuirse al exceso de Se y al aumento de la actividad de la G6PD (Lu and Holmgren, 2014; Montano *et al.*, 2014). Esto podría ser un mecanismo compensatorio que tiene como objetivo aumentar los niveles de tioles y podría estar asociado con el consumo de antioxidantes en exceso que pueden ser proporcionados por la infusión de HSL en alto porcentaje (Lu and Holmgren, 2014).

Otra enzima que aumentó su actividad en este estudio fue la GPx. Esta enzima contiene selenio-cisteína en su centro catalítico y estuvo sobreactivada en el homogeneizado de la aorta de las ratas del grupo que consumió la infusión de HSL al 6% (**Figura 29**  $p=0.03$ ). Este aumento de la actividad podría producirse por el exceso de sustratos como el GSH y el NADPH que fueron proporcionados por la G6PD y por la elevación del Se. Además, los ROS moderados son necesarios para mantener la formación de disulfuros (tioles) en la célula y la sobreexpresión de GPx puede llevar



a la disminución de los disulfuros de las proteínas que se relacionan con la reducción de la señalización de los factores de crecimiento y disminución de la función mitocondrial (Handy *et al.*, 2009).

Por otra parte, la GST es una enzima antioxidante, que participa en la desintoxicación de los RL previniendo los efectos de la LPO (Beutler *et al.*, 1988; Krajka-Kuzniak *et al.*, 2008). Esta enzima conjuga al GSH con agentes electrofílicos y xenobióticos como drogas, toxinas, agentes cancerígenos y detoxifica al organismo de ellos (Beutler *et al.*, 1988; Hayeshi *et al.*, 2007). Nuestros resultados mostraron disminución significativa en la actividad de la GST en los grupos que consumieron la infusión de HSL al 3% y 6% como se puede observar en la **Figura 30**. Se ha reportado que la administración de ácido tánico a dosis de 80 mg/kg, reduce la actividad de las subunidades “mu” y “alpha” de la GST en el hígado (Krajka-Kuzniak *et al.*, 2008), asimismo, en este estudio se observó la disminución de la subunidad “pi” de la GST al proporcionar ácido protocatecuico (Krajka-Kuzniak *et al.*, 2008). En otro estudio se observó que concentraciones elevadas de flavonoides presentes en algunos compuestos naturales, como en la HSL podrían inhibir la actividad de la GST y por consiguiente favorecer el aumento de la LPO (Hayeshi *et al.*, 2007), estos hallazgos se podrían atribuir al patrón de hidroxilación que presentan estos compuestos, se ha reportado que los glucósidos flavonoides son más débiles, es decir, tienen menos potencia para inhibir a la GST (Zhang and Das, 1994). Esto sugiere que el exceso de ácido protocatecuico en la infusión al 6% de HSL puede favorecer la disminución en la actividad de la GST en la aorta y contribuir al incremento en la LPO (**Figura 31**).

En resumen, el exceso de antioxidantes como flavonoides, ácido protocatecuico y polifenoles proporcionados por la infusión con cantidades crecientes de HSL aumenta algunas enzimas del sistema antioxidante que contribuye a disminuir los ROS y conducir a ER, aunado a la hipertrofia de la pared de la aorta que altera la reactividad vascular, aumenta la presión arterial, lo cual puede favorecer la hipertensión arterial.





## 16. Conclusiones

1. La infusión de HSL al 3% y 6% favoreció el incremento de la presión arterial, al proporcionar exceso de algunos componentes como flavonoides, polifenoles, entre otros, que favorecieron la vasoconstricción y redujeron la vasodilatación por consiguiente se alteró la respuesta vascular.
2. El exceso de los antioxidantes proporcionados por los diferentes porcentajes de infusión de HSL favoreció el incremento en las fibras elásticas y en el grosor de la pared de aorta torácica.
3. El exceso en el porcentaje de infusión de la HSL favoreció el incremento en la actividad de algunos componentes del sistema antioxidante como la G6PD, la TrxR, la GST y la GPx.
4. El exceso de los componentes antioxidantes proporcionados por los diferentes porcentajes de infusión de HSL modificaron la acción del  $K_2O$  y  $H_2O_2$ , que actúan sobre las respuestas vasoconstricción y vasodilatación de la aorta.
5. El incremento en el grosor de la pared y las fibras elásticas en la aorta, favorecieron el incremento de la presión arterial y por consiguiente la generación de un ambiente de inflamación, que se puede ver reflejado en el incremento de la concentración de los  $NO_3^-$  y  $NO_2^-$ .
6. El exceso de flavonoides presentes en la infusión al 6% de HSL redujeron la actividad de la GST aunado al incremento en las concentraciones de Se que favorecieron el incremento en la LPO.





## 17. Resumen gráfico

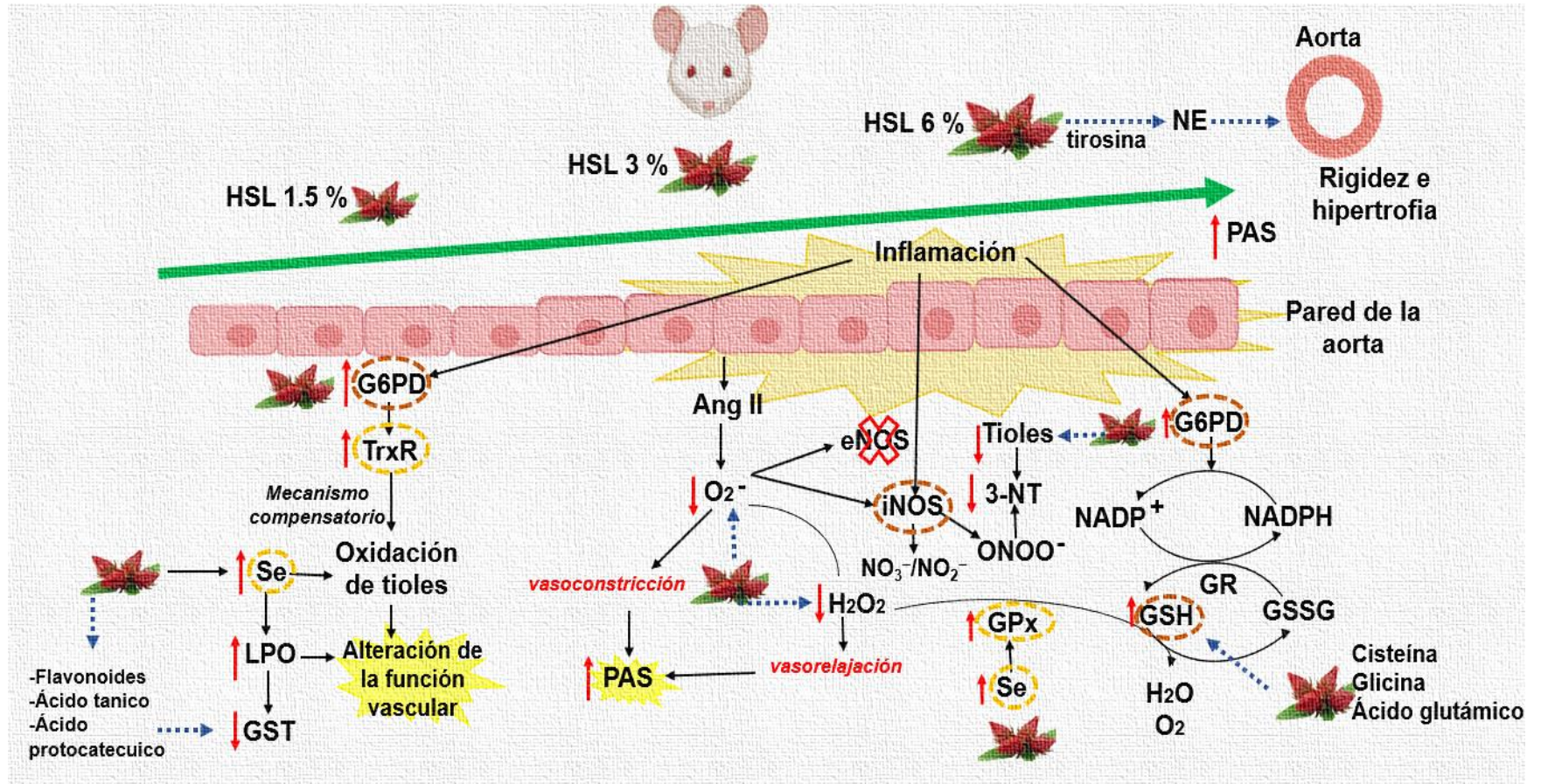


Figura 32. Propuesta de las implicaciones fisiológicas de la modulación de la reactividad vascular por estrés reductor asociado al consumo excesivo de *Hibiscus sabdariffa Linnaeus*



## 18. REFERENCIAS

Ahmed S., Kharroubi W., Kaoubaa N., Zarrouk A., Batbout F., Gamra H., Najjar M., Lizard G., Hininger-Favier I. and Hammami M. Correlation of trans fatty acids with the severity of coronary artery disease lesions. *Lipids in Health and Disease*. 2018; 17: 1-13.

Aisa-Alvarez A., Soto M., Guarner-Lans V., Camarena-Alejo G., Franco-Granillo J., Martínez-Rodríguez E., Gamboa R., Manzano L. and Pérez-Torres I. Usefulness of Antioxidants as Adjuvant Therapy for Septic Shock: A Randomized Clinical Trial. *Medicina*. 2020; 56: 1-14.

Ajiboye T., Raji H., Adeleye A., Adigun N., Giwa O., Ojewuji O. and Oladiji A. Hibiscus sabdariffa calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative rout in fructose-induced metabolic syndrome rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; 96: 1522-1531.

Ariza R., Serrano V., Casimiro A., Barrios A., Otero M., Avendaño C. and Noriega D. Características bioquímicas y calidad nutracéutica de cinco variedades de Jamaica cultivadas en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2017; 8: 269-280.

Arnér E. Focus on mammalian thioredoxin reductases-Important seleno proteins with versatile functions. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*. 2009; 1790: 495-526.

Baños G. and Franco M. Participación del endotelio en procesos fisiopatológicos. *Archivos de Cardiología de México*. 1993; 63: 267-274.

Belandria J., Cáceres A., Bravo B., Chávez G., Ysambertt F., Márquez N. and Hernández M. Desarrollo de un método cinético para la determinación espectrofotométrica del selenito. *Ciencia*. 2011; 19: 72-83.



Bellezza I., Giambanco I., Minelli A. and Donato R. Nrf2 -Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *BBA-Molecular Cell Research*. 2018; 1865: 721-733.

Benedikt L., Bancone G., Seidlein L., Thriemer K., Richards J., Domingo G, and Price R. Methods for the field evaluation of quantitative G6PD diagnostics: review. *Malaria Journal*. 2017; 16: 1-9.

Benhar M. and Stamler J. A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nature Cell Biology*. 2005; 7: 645-646.

Berillis P. The Role of Collagen in the Aorta's structure. *The Open Circulation and Vascular Journal*. 2013; 6: 1-8.

Beutler E., Dunning D., Dabe I. and Forman L. Erythrocyte glutathione S-transferase deficiency and hemolytic anemia. *Blood*. 1988; 72: 73-77.

Birben E., Sahiner U., Sackesen C., Erzurum S. and Kalayci O. Oxidative stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012; 5: 1-19.

Blanes J., Lluch I., Morillas C., Nogueira J. and Hernández A. Tratado de pie diabético. Capítulo 2. España, 2002; 19-31.

Borai A., Callum L. and Gordon A. The biochemical assessment of insulin resistance. *The Association for Clinical Biochemistry*. 2007; 44: 324-342.

Bourgonje M., Bourgonje A., Abdulle A., Kieneker L., Gemert S., Gansevoort R., Bakker S., Mulder D., Pasch A., Saleh J., Gordijn S. and Goor H. Systemic Oxidative Stress, aging and the risk of cardiovascular events in the general female population. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021; 8: 1-13.

Branco V. and Carvalho V. The thioredoxin system as a target for mercury compounds. *Biochemical et biophysical acta. General subjects*. 2018; 12: 1-32.

Bretón R. and Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology*. 2014; 2: 529-534.



Cisneros R., Oré R., Arnao I. and Suárez S. Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidiummeyerii*Walp). Anales de la Facultad de Medicina. 2011; 72: 107-1011.

Costa-Rocha I., Bonnlaender B., Sievers H., Pischel I. and Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L.-A phytochemical and pharmacological review. Food chemistry. 2014; 165: 424-443.

Decker E. Phenolics: prooxidants or antioxidants?. Nutrition Reviews. 1997; 55: 396-398.

DeMartino A., Kim-Shapiro D., Patel R. and Gladwin M. Nitrite and nitrate chemical biology and signaling. British Journal of Pharmacology. 2019; 176: 228-245.

Domínguez A., Contreras I. and Estrada J. Oxidative damage in lipids in the central nervous system and spleen in iron-deficient mice. Multidisciplinary Scientific Journal. 2017; 27: 78-83.

Dong J., Kathleen K. and Shao-yu C. Nrf2-Mediated Transcriptional Induction of antioxidant response in mouse Embryos Exposed to Ethanol in vivo: Implications for the Prevention of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. Antioxidant & Redox signaling. 2008; 10: 2023-2033.

Endemann D. and Schiffrin E. Endothelial dysfunction. Journal of the American Society of Nephrology. 2004; 15: 1983-1992.

Erel O. and Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. 2014; 1-7.

Fleming I. and Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2003; 284: R1-R12.

Flohé R. and Maiorino M. Glutathione peroxidases. Biochimica et Biophysica Acta. 2013; 1830: 3289-3303.



Folch L. and Sloane-Stanley C. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957; 195: 697-709.

Garzón G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biológica Colombiana*. 2008; 13: 27-36.

George S., Brat P., Alter P. and Amiot M. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in plant-derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 1370-1373.

González A., Rosas Ó., Alexanderson G., Fernández C., Camacho J. and Elizondo S. Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular. Capítulo 13: disfunción endotelial y síndrome metabólico. Ed. Intersistemas. México, 2004; 87-130.

Griendling K., Sorescu D. and Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*. 2000; 5: 494-501.

Griess J. Patents Relating to Chemistry:213,563. And 213,564 Coloring matters. *Journal of the American Chemical Society*. 1879; 1879: 1.

Grune T. Oxidants and antioxidative defense. *Human & Experimental Toxicology*. 2002; 2: 61-62.

Guan T., Song J., Wang Y., Guo L., Yuan L., Zhao Y., Gao Y., Lin L., Wang Y. and Wey J. Expression and characterization of recombinant bifunctional enzymes with glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 110: 188-195.

Gutiérrez D., Ortiz C. and Mendoza A. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología 2008. 2008; 1108-1-1108-4.

Gutteridge J. The use of standards for malonyldialdehyde. *Analytical Biochemistry*. 1975; 69: 518-526.





Handy D., Joseph J. and Loscalzo J. Selenium, a Micronutrient That Modulates Cardiovascular Health via Redox Enzymology. *Nutrients*. 2021; 13: 1-22.

Handy D., Lubos E., Yang Y., Galbraith J., Kelly N., Zhang Y-Y., Leopold J. and Loscalzo J. Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 18: 11913-11921.

Hariharan S. and Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology*. 2020; 1-29.

Hayeshi R., Mutingwende I., Mavengere W., Masiyanise V. and Mukanganyama S. The inhibition of human glutathione S- transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 286-295.

Helmut S. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997; 2: 291-295.

Hodnick W., Kung F., Roettger W., Bohmont C. and Pardini R. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure-activity study. *Biochemical Pharmacology*. 1986; 14: 2345-2357.

Ikeda U. and Shimada K. Nitric oxide and cardiac failure. *Clinical Cardiology*. 1997; 20: 837-841.

Jagota S. and Dani H. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. 1982; 127: 178-182.

Jamwal S. and Sharma S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders. *Inflammation Research*. 2018; 67: 391-405.

Janus A., Szahidewicz-Krupska E., Mazur G. and Doroszko A. Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Constitute a Common Therapeutic Target in Cardiometabolic Disorders. *Mediators of Inflammation*. 2016; 2016: 1-10.



Jia z., Tang M. and Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999; 64: 555-559.

Kameritsch P., Singer M., Nuernbergk C., Rios N., Reyes A., Schmidt K., Kirsch J., Schneider H., Muller S., Pogoda K., Cui R., Kirchner T., Wit C., Lange-Sperandio B., Pohl U., Conrad M., Radi R. and Beck H. The mitochondrial thioredoxin reductase system (TrxR2) in vascular endothelium controls peroxynitrite levels and tissue integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2021; 118: 1-12.

Keum Y. and Choi B. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules*. 2014; 19: 10074-10089.

Kirsch J., Scheneider H., Pagel J., Rehberg M., Singer M., Hellfritsch J., Chillo O., Schubert K., Qiu J., Pogoda K., Kameritsch P., Uhl B., Pircher J., Deindl E., Müller S., Kirchner T., Pohl U., Conrad M. and Beck H. Endothelial Dysfunction, and a Prothrombotic, Proinflammatory Phenotype Is Caused by Loss of Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016; 36: 1891-1899.

Krajka-Kuzniak V., Szaefer H. and Baer-Dubowska W. Hepatic and extrahepatic expression of glutathione S-transferase isozymes in mice and its modulation by naturally occurring phenolic acids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008; 25: 27-32.

Laughton M., Halliwell B., Evans P. and Hoult J. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology*. 1989; 17: 2859-2865.

Laurence R. and Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 1976; 71: 952.

Laurent S., Cockcroft J., Van Bortel L., Boutouyrie P., Giannattasio C., Hayoz D., Pannier B., Vlachopoulos C., Wilkinson I. and Boudier H. Expert consensus



document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European Heart Journal*. 2006; 27: 2588-2605.

Lee C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse. *Methods in Enzymology*. 1982; 89: 252-257.

Lee J., Durst R. and Wrolstad R. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the Ph Differential Method: Collaborative Study. *Dietary Supplements*. 2005; 88: 1269-1278.

Lee K. and Jeong D. Biomodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: The selenium paradox (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2012; 5: 299-304.

Leopold J., Zhang Y., Scribner A., Stanton R. and Loscalzo J. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Overexpression Decreases Endothelial Cell Oxidant Stress and Increases Bioavailable Nitric Oxide. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23: 411-417.

Lessmann D., Schimz K. and Kurz G. D-glucose-6-phosphate dehydrogenase (Entner-Doudoroff enzyme) from *Pseudomonas fluorescens*. Purification, properties and regulation. *European Journal of Biochemistry*. 1975; 59: 545-559.

Lu J. and Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 66: 75-87.

McEniery C., Wilkinson I. and Avolio A. Age, hypertension and arterial function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007; 34: 665-671.

Montano S., Lu J., Gustafsson T. and Holmgren A. Activity assays of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase: Fluorescent disulfide substrates, mechanisms, and use with tissue samples. *Analytical Biochemistry*. 2014; 449: 139-146.





Norhaizan M., Fong S., Amin I. and Chew L. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*. 2010; 122: 1055-1060.

Olmos R. Fisiología veterinaria e introducción a la fisiología de los procesos productivos. Sección IV. Sistema cardiovascular. Ed. FMVZ. México, 2010; 327-347.

Ooshima A., Fuller G., Cardinale G., Spector S. and Underfriend S. Increased collagen synthesis in blood vessels of hypertensive rats and its reversal by antihypertensive agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1974; 71: 301-323.

Pacher P., Beckman J. and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 2007; 87: 315-424.

Paglia D. and Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. 1967; 70: 158-169.

Passi S., Picardo M. and Nazzaro-Porro M. Comparative cytotoxicity of phenols in vitro. *The Biochemical Journal*. 1987; 2: 537-542.

Peiró C., Romacho T., Azcutia V., Villalobos L., Fernández E., Bolaños J., Moncada S. and Sánchez-Ferrer C. Inflammation, glucose, and vascular cell damage: the role of the pentose phosphate pathway. *Cardiovascular Diabetology*. 2016; 15: 1-15.

Pérez-Torres I., Guarner V. and Rubio M. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18: 1-26.

Pérez-Torres I., Manzano-Pech L., Rubio-Ruíz M., Soto M. and Guarner-Lans V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders. *Molecules*. 2020; 25: 1-27.



Pérez-Torres I., Roque P., El Hafidi M., Díaz-Díaz E. and Baños G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research*. 2009; 43: 761-771.

Pérez-Torres I., Soto M., Manzano-Pech L., Díaz-Díaz E., Soria-Castro E., Rubio-Ruiz M. and Guarner-Lans V. Oxidative Stress in Plasma from Patients with Marfan Syndrome Is Modulated by Deodorized Garlic Preliminary Findings. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022; 2022: 1-10.

Pérez-Torres I., Torres J., Guarner V., Díaz E., Perez-Peña M., Romero A. and Manzano L. Myocardial Protection from Ischemia-Reperfusion Damage by the Antioxidant Effect of Hibiscus sabdariffa Linnaeus on Metabolic Syndrome Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019: 1-13.

Pérez-Torres I., Zúñiga A., Beltrán U., Díaz E., Martínez R. and Guarner V. Modification of the liver fatty acids by Hibiscus sabdariffa Linnaeus (Malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. *Clinical and experimental hypertension*. 2014; 36: 123-131.

Prasongwatana V., Woottisin S., Sriboonlue P. and Kukongviriyapan V. Uricosuric effect of roselle (Hibiscus sabdariffa) in normal and renal-stone former subject. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 117: 491-495.

Pugsley M. and Tabrizchi R. The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000; 44: 333-340.

Rahman I., Kode A. and Biswas S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 2006; 6: 3159-3165.

Ramírez A., Balderas E., Saldaña G., Díaz E. and Hafidi M. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clinical Science*. 2014; 126: 19-29.



Rees D., Palmer R., Hodson H. and Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *British Journal of Pharmacology*. 1989; 96: 418-424.

Rhee S., Kang S., Jeong W., Chang T., Yang K and Woo H. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current Opinion in Cell Biology*. 2005; 17: 183-189.

Rivero-Vilches F., de Frutos S., Rodríguez M., Rodríguez D. and Saura M. Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPC. *Nefrología*. 2001; 21: 233-239.

Robaszkiewicz A., Balcerczyk A. and Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biology international*. 2007; 31: 1245-1250.

Roman M., Jitaru P. and Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 2014; 6: 25-54.

Sánchez-Rangel J., Benavides J., Basilio J., Cisneros-Zevallos L. and Jacobo-Velázquez D. The Folin- Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*. 2013; 5: 5990-5999.

Sandoo A., ZantenV., Metsios G., Carroll D. and Kitas G. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. 2010; 4: 302-312.

Semsri S., seatew C., Rattanabunyong S., Ruekit S., Horata N., Panya A., Yenchitsomanus P., Sawatdichaikul O. and Choowongkomon K. In-vitro studies of anti-EGFR tyrosine kinase activity of Thai nutraceutical plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2020; 19: 199-206.

Sergediene E., Jönsson K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Rietiens I. and Cenas N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS letters*. 1999; 462: 392-396.



Sharapov M., Goncharov R., Gordeeva A., Novoselov V., Antonova O., Tikhaze A. and Lankin V. Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes. *Doklady Biochemistry Biophysics*. 2016; 1: 410-412.

Silver F., Horvath I. and Foran D. Viscoelasticity of the vessel wall: the role of the collagen and elastic fibers. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. 2001; 29: 279-301.

Singh F., Charles A., Schlagowski A., Bouitbir J., Bonifacio A., Piguard F., Krähenbühl S., Geny B. and Zoll J. Reductive stress impairs myoblasts mitochondrial function and triggers mitochondrial hormesis. *Biochemical et Biophysical Acta*. 2015; 7: 1574-1585.

Sousa R. and Marletta M. Inhibition of cytochrome P-450 activity in rat liver microsomes by the naturally occurring flavonoid, quercetin. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1985; 240: 345-357.

Stanton R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2012; 362-369.

Steinberg S. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circulation Research*. 2013; 112: 393-405.

Taberner A., Baldino L., Cardea S., Valle E. and Reverchon E. A Phenomenological Approach to Study Mechanical Properties of Polymeric Porous Structures Processed Using Supercritical CO<sub>2</sub>. *Polymers*. 2019; 11: 1-17.

Tapiero H., Townsend D. and Tew K. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003; 57: 134-144.

Taverne Y., Bogers A., Duncker B. and Merkus D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013: 2013: 1-15.



Terada A., Yoshida M., Seko Y., Kobayashi T., Yoshida K., Nakada M., Nakada K., Echizen H., Ogata H. and Rikihisa T. Active oxygen species generation and cellular damage by additives of parenteral preparations: selenium and sulfhydryl compounds. *Nutrition*. 1999; 15: 651-655.

Tewari R., Hadacek F., Sassmann S. and Lang I. Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 2013; 91: 74-83.

Tonggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2008;13: 102-108.

Tortora G. and Grabowski S. *Principios de anatomía y fisiología*. Capítulo 21. Ed. Oxford. México. 2003; 1-24.

Touyz R., Ríos F., Lopes R., Neves K., Camargo L. and Montezano A. Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*. 2020; 36: 659-670.

Tropf M., Nelson O., Lee P. and Weng H. Cardiac and Metabolic Variables in Obese dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2017; 31: 1000-1007.

Tseng T., Kao T., Chu C., Chou F., Lin W. and Wang C. Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukaemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochemical Pharmacology*. 2000; 60: 307-315.

Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography*. 2007; 851: 51-70.

Tsutsumi Y., Matsubara H., Masaki H., Kurihara H., Murasawa S., Takai S., Miyazaki M., Nozawa Y., Ozono R., Nakagawa K., Miwa T., Kawada N., Mori Y., Shibasaki Y., Yanaka T., Fujiyama S., Koyama Y., Fujiyama A., Takahashi H. and Iwasaka T. Angiotensin II type2 receptor overexpression activates the vascular



kininsystem and causes vasodilation. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999; 104: 925-935.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M., Mazur M. and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39: 44-84.

Waltz P., Escobar D., Botero A. and Zuckerbraun B. Nitrate/Nitrite as Critical Mediators to Limit Oxidative Injury and Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015; 23: 328-339.

Wätien W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y. and Kampkötter A. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of nutrition*. 2005; 135: 525-531.

Whayne T., Parinandi N. and Maulik N. Thioredoxins in cardiovascular disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015; 93: 1-36.

White P. Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*. 2016; 117: 217-235.

Xiao W. and Loscalzo J. Metabolic responses to reductive stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2020; 32: 1330-1347.

Zhang H., Limphong P., Pieper J., Liu Q., Rodesch C., Christians E and Benjamin I. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012; 26: 1442-1451.

Zhang H., Luo Y., Zhang W., He Y., Dai S., Zhang R., Huang Y., Bernatchez P., Giordano F., Shadel G., Sessa W. and Min W. Endothelial- specific expression of mitochondrial thioredoxin improves endothelial cell function and reduces atherosclerotic lesions. *The American Journal of Pathology*. 2007; 170: 1108-1120.



Zhang K. and Das N. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S- transferases. *Biochemical Pharmacology*. 1994; 47: 2063-2068.


Zitka O., Skalickova S., Gumulec J., Masarik M., Adam V., Hubalek J., Trnkova L., Kruseova J., Eckschlager T. and Kizek R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters*. 2012; 4: 1247-1253.

Zúñiga-Muñoz A., Guarner V., Díaz-Cruz A., Díaz-Díaz E., Nava-Cuellar C., Beltrán-Rodríguez U. and Pérez-Torres I. Modulation of oxidative stress in fatty liver of rat with metabolic syndrome by hibiscus sabdariffa. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*. 2013; 13: 19



## 19. ANEXO

### 1. Artículo

 **cells**  
an Open Access Journal by MDPI


Indexed in: PubMed  
CITESCORE 6.7 SCOPUS  
IMPACT FACTOR 7.666

# CERTIFICATE OF PUBLICATION

Certificate of publication for the article titled:  
Excessive Consumption *Hibiscus sabdariffa* L. Increases Inflammation and Blood Pressure in Male Wistar Rats via High Antioxidant Capacity: The Preliminary Findings

Authored by:  
Linaloe Manzano-Pech; Verónica Guarner-Lans; María Elena Soto; Eulises Díaz-Díaz; Sara Caballero-Chacón; Roberto Díaz-Torres; Félix Leao Rodríguez-Fierros; Israel Pérez-Torres

Published in:  
*Cells* 2022, Volume 11, Issue 18, 2774

 **MDPI** Academic Open Access Publishing since 1996  
Basel, September 2022





Article

# Excessive Consumption *Hibiscus sabdariffa* L. Increases Inflammation and Blood Pressure in Male Wistar Rats via High Antioxidant Capacity: The Preliminary Findings

Linaloe Manzano-Pech <sup>1</sup>, Verónica Guarnier-Lans <sup>2</sup>, María Elena Soto <sup>3</sup>, Eulises Díaz-Díaz <sup>4</sup>, Sara Caballero-Chacón <sup>5</sup>, Roberto Díaz-Torres <sup>6</sup>, Félix Leao Rodríguez-Fierros <sup>7</sup> and Israel Pérez-Torres <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Cardiovascular Biomedicine, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, México City 14080, Mexico

<sup>2</sup> Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, México City 14080, Mexico

<sup>3</sup> Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan, México City 14080, Mexico

<sup>4</sup> Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, Tlalpan, México City 14000, Mexico

<sup>5</sup> Department of Physiology and Pharmacology UNAM, Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia, Av. Universidad 3000, Coyoacán 04510, Mexico

<sup>6</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Km 2.5 Carretera Cuatitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuatitlán Izcalli 54714, Mexico

<sup>7</sup> Laboratorio de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro 76230, Mexico

\* Correspondence: israel.perez@cardiologia.org.mx or pectorisr@yahoo.com.mx; Tel.: +52-5573-2911 (ext. 25203); Fax: +52-5573-0926



**Citation:** Manzano-Pech, L.; Guarnier-Lans, V.; Soto, M.E.; Díaz-Díaz, E.; Caballero-Chacón, S.; Díaz-Torres, R.; Rodríguez-Fierros, F.L.; Pérez-Torres, I. Excessive Consumption *Hibiscus sabdariffa* L. Increases Inflammation and Blood Pressure in Male Wistar Rats via High Antioxidant Capacity: The Preliminary Findings. *Cells* **2022**, *11*, 2774. <https://doi.org/10.3390/cells11182774>

Academic Editors: Neven Zarkovic and Tiziana Guarnieri

Received: 12 July 2022

Accepted: 31 August 2022

Published: 6 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Hibiscus sabdariffa* L. (HSL) has high amounts of antioxidants and many beneficial effects in several pathologies. However, few studies describe the possible harmful effects of high concentrations of HSL. Here we evaluate the effect of excessive and chronic consumption of infusions with different percentages of HSL on some oxidative stress markers in serum, and the possible association with inflammation and increased systolic blood pressure (SBP), in healthy rats. A total of 32 male Wistar rats were used to form 4 groups with 8 animals each. Group 1 control (drinking tap water), group 2, 3 and 4, drinking water supplemented with 15, 30 and 60 g/L of HSL calyxes respectively. SBP was evaluated and determinations in serum of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ratio, glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC), selenium (Se), TNF-α, IL-1α/IL-1β, IL-1β, IL-10, extracellular superoxide dismutase (ECSOD), thioredoxin reductase (TrxR) and glutathione peroxidase (GPx) activities, were evaluated. The SBP ( $p = 0.01$ ), GPx activity, GSH, TAC, Se, TNF-α and ECSOD activities ( $p \leq 0.001$ ) and IL-1α/IL-1β, IL-1β, TrxR and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ( $p \leq 0.05$ ), were increased but IL-10 ( $p < 0.001$ ) was decreased in rats that consumed the 3 and 6% HSL infusions. The excessive and chronic consumption of HSL may increase the TAC that could lead to a proinflammatory state which is associated with hypertension.

**Keywords:** proinflammatory interleukins; hypertension; *Hibiscus sabdariffa* L.; oxidative stress

## 1. Introduction

The antioxidant defense systems are critical for maintaining health in biological subjects and they are constituted by enzymatic and non-enzymatic antioxidant components. These defenses are in continuous demand of reducing equivalents provided by glutathione (GSH) and of exogenous compounds including vitamins, amino acids, carotenoids, flavonoids and polyphenols that contribute to counteract oxidative stress (OS) [1]. However, high concentrations and chronic consumption of these agents may lead to prooxidant effects. Nevertheless, few studies have highlighted the prooxidant activity of polyphenols



## 2. Constancia de participación en las VI Jornadas de Investigación



### 3. Carta de aprobación del SICUAE.



#### PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

#### SICUAE - SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES EXPERIMENTALES

Protocolo Número: SICUAE.DC-2019/3-4

**Título del Proyecto:** Modulación de la reactividad vascular por estrés reductor asociado al exceso de Hibiscus Sabdariffa Linnaeus (Malvaceae)

**Investigador Responsable:** Israel Pérez Torres

**Tesista:** Manzano Pech Linaloe Guadalupe

Después de haber revisado el proyecto de investigación el día 20 de septiembre del presente, el SICUAE consideró que reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tiene objeción en que se realicen los procedimientos planteados tal y como fueron descritos en el protocolo.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Ciudad Universitaria, CDMX. a 03 de diciembre del 2019





**EL COORDINADOR**

**DR. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT**

- Unidad de Posgrado, Edificio B, Primer Piso, B107, Circuito del Posgrado, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Cd. de México, CP 04510. Tels.: 01 (55) 5623-7005 y 01 (55) 5623-0222 ext.: #80023, #80005, #80024.
- Edificio 4 Posgrado, Planta alta, Fac. de Med. Vet. y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Cd. de México, CP 04510. Tels.: 01 (55) 5622-5854 al 57, Fax: 01 (55) 5616-7197 y 5616-2342.
- Secretaría Técnica de Producción y Salud Animal, FES-Cuautitlán: Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, Km 2.5 Carretera Cuautitlán Toluca, Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54714, Tel.: 5623-1939 ext.: 39405.
- Edificio A, planta baja de la Secretaría de Enseñanza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Nueva Sede, Circuito Maestro Mario de la Cueva (pasando el Jardín Botánico) Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Cd. de México, CP 04510, Tel.: 01 (55) 5622-8908 ext.: 47985.



#### 4. Carta de aprobación del CICUAL

   **INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA**  
IGNACIO CHÁVEZ   
*Renacimiento de la Excelencia*

Ciudad de México a 11 de Diciembre del 2019.  
**Ref: BT/227/2019**  
**Asunto: Aprobación del Protocolo.**

**Dr. Israel Pérez Torres.**  
Investigador en Ciencias Medicas "C".  
Departamento de Biomedicina Cardiovascular.  
Responsable del protocolo.  
Presente:

Estimado Dr. Pérez:

Por medio de la presente, me dirijo a usted para saludarle e informarle sobre la revisión y análisis del protocolo presentado por usted titulado:

**"Modulación de la reactividad vascular por estrés reductor asociado al consumo excesivo de Hibiscus Sabdariffa Linnaeus (Malvaceae)"**

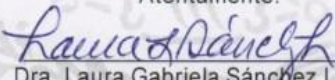
Le comento que ha sido revisado por el Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio "C.I.C.U.A.L." de esta Institución y a quedado aprobado y registrado con el siguiente número:

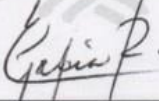
**INC/CICUAL/011/2019.**

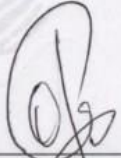
No obstante, el desarrollo de la aprobación del presente protocolo queda sujeto al Comité de Investigación.

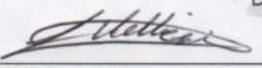
Sin más por el momento agradecemos la atención y reciba un cordial saludo.

Atentamente:

  
Dra. Laura Gabriela Sánchez Lozada.  
Presidenta del CICUAL.


  
Dra. Edilma Tapia Rodríguez.  
Vocal del CICUAL.

  
Dr. Oscar Pérez Méndez.  
Vocal del CICUAL.

  
MVZ Juan Villegas Juache.  
Secretario del C.I.C.U.A.L.

C.c.p: Comité de Investigación.  
JVJ

Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, C.P.: 14080, Ciudad de México,  
Teléfono: 5573-2911, ext. 25102.

 **2019**